



# **Estudio de la biodiversidad bacteriana de ecosistemas del departamento del Atlántico como fuente de posibles compuestos antituberculosis y antibacterianos**

Anthony Williams Bernal Martínez

Universidad del Norte  
Decanatura de Ciencias Básicas, Departamento de Química y Biología  
Barranquilla, Colombia  
2019



# **Estudio de la biodiversidad bacteriana de ecosistemas del departamento del Atlántico como fuente de posibles compuestos antituberculosis y antibacterianos**

**Anthony Williams Bernal Martínez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Naturales**

Director:

Dr. Oscar Vidal Orjuela

Codirector:

Dr. Juan David Guzmán Vásquez

Línea de investigación:

Bioactividades

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Química y Biología

Universidad del Norte

Departamento de Química y Biología

Km 5 vía Puerto Colombia, Atlántico

2019

## RESUMEN:

A partir de bacterias provenientes de muestras de algunos ecosistemas del departamento del Atlántico, (i) se diseñaron protocolos de aislamiento, crecimiento y medios de cultivo, específicos para las bacterias del ecosistema del caribe Colombiano de los cuales se obtuvo un total de 49 aislamientos bacterianos seleccionados a partir de particularidades interesantes de crecimiento (morfología similar a actinobacterias en placa, formación de halos, pigmentos y micelio); (ii) se realizó un cribado y se seleccionaron 9 aislamientos cuyos extractos presentaron actividad biológica contra la cepa *Mycobacterium bovis* BCG (similitud del 99% con la secuencia genómica de *Mycobacterium tuberculosis*) mediante un ensayo preliminar de crecimiento en placa. Además los extractos se probaron en placas de microdilución, de los cuales tres mostraron inhibición contra las cepas *Staphylococcus aureus* y cuatro contra *Escherichia coli*; y (iii) se identificó la taxonomía por análisis molecular, de las bacterias con actividad anti-micobacterial. Este proyecto siembra un precedente en nuestra comunidad científica en cuanto a protocolos de aislamiento, crecimiento e identificación de nuestros recursos microbiológicos con un alto potencial de bioprospección para la obtención de compuestos/moléculas con actividad anti microbiana.

**Palabras clave:** Actividad anti-micobacteriana, actividad antibacterial, *Mycobacterium bovis* BCG, bioprospección, identificación molecular.

## **Abstract**

From the Colombian Caribbean was isolated 49 different bacterial groups which showed biological activity against *Mycobacterium bovis* BCG (99% similarity to *Mycobacterium tuberculosis*). From these groups were selected the bacterial extracts which showed the highest activity. The 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification for isolates found species of *Bacillus cereus*, *Nocardiopsis alba* and *Streptomyces sampsonii*. In parallel, it was tested the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 using the 96 well plate method. In addition, it was designed specific protocols for the bacterial isolation, growth and culture media process in order to optimise its growth under laboratory conditions.

**Keywords:** Anti-mycobacterial activity, antibacterial activity, *Mycobacterium bovis* BCG, bioprospecting, molecular identification.

## INTRODUCCIÓN

Colombia, seguida de Brasil, lidera la lista del denominado grupo de países con mayor diversidad del planeta Tierra, el cual alberga los mayores porcentajes de biodiversidad del mundo. Colombia ocupa solo el 1% de la superficie terrestre, pero acoge el 10% de la biodiversidad total del planeta <sup>1,2</sup>. Pese a la riqueza ecológica y biológica, es apenas reciente el interés por la información que se puede adquirir acerca de los microorganismos en los diferentes ecosistemas del país, como las bacterias, que son los organismos más abundantes del planeta. A pesar de ello son menores los registros que se tienen de bacterias, en comparación con otros organismos de los ecosistemas colombianos <sup>3</sup>. La región Caribe no se encuentra exenta de esta situación, donde se lleva un registro únicamente de zonas costeras y marinas, en la Colección de Bacterias del Museo de Historia Natural Marina de Colombia “Makuriwa” – INVEMAR <sup>4</sup>. Por otro lado, el Sistema de Información sobre Biodiversidad Marina (SiBM), facilita información acerca de bacterias marinas asociadas a degradación de Contaminantes Orgánicos Persistentes, del que solo se provee información de las características macroscópicas y microscópicas sin ser identificadas aún. Vale recalcar que en el listado de cepas del SiBM, no aparecen registros del Atlántico, a pesar de ser un departamento que limita con el mar Caribe <sup>5</sup>. Por consiguiente, sigue siendo escasa la información de las bacterias del departamento del Atlántico, su bioprospección o generación de moléculas de interés científico como los antibióticos, producidos por estos microorganismos.

Como lo describió Selman Waksman en 1941, los antibióticos son moléculas pequeñas provenientes de bacterias u hongos, capaces de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Estos han marcado un precedente importante en nuestra historia en el tratamiento de enfermedades, con el desarrollo de antibióticos como la penicilina, estreptomicina, cloranfenicol y la tetraciclina (Tabla 1) entre los años 1945 a 1955, dando inicio a lo que se conoce como la edad dorada de los antibióticos <sup>6</sup>. Sin embargo, actualmente la resistencia acelerada a los antibióticos por parte de patógenos humanos, sea por uso inadecuado o fácil acceso a estos, ha causado que los tratamientos contra este tipo de enfermedades sean ineficientes. Esta situación lleva a la búsqueda constante de moléculas con actividad antimicrobiana <sup>7,8</sup>.

Miles de moléculas con actividad antibacteriana han sido descubiertas, pero menos del 2% han podido ser utilizadas para tratar enfermedades, principalmente por la alta toxicidad o por la poca capacidad de absorción que presentan <sup>9</sup>. Las bacterias constituyen en gran porcentaje a los metabolitos descubiertos contra microorganismos patógenos <sup>10</sup>. Estas se encuentran distribuidas en la mayoría de hábitats conocidos, incluidos hábitats extremos, y generalmente su producción se asocia con la alta actividad de degradación de material orgánico o moléculas recalcitrantes <sup>11-13</sup>. Las actinobacterias especialmente, son la mayor fuente de productos naturales de uso clínico (más de la mitad de especies conocidas son capaces de generar metabolitos biológicamente activos), sin embargo se estima que menos de un tercio de estos metabolitos ha sido descubierto <sup>14</sup>; lo que les otorga importancia farmacológica debido al creciente problema de la resistencia antibiótica de patógenos que cada vez se hacen más difíciles de controlar <sup>15</sup>.

Hace aproximadamente 40 años, dada la amplia disponibilidad de antibióticos, parecía impensable no tratar de manera efectiva las infecciones bacterianas. Sin embargo la aparición de las bacterias resistentes, y la cada vez más complicada lucha contra infecciones causadas por estas bacterias, dan cabida a la búsqueda y generación de nuevos medicamentos para tratamientos que se hacen cada vez menos eficientes <sup>16</sup>. Las bacterias han evolucionado de manera tal que han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia para sobrevivir. Estos mecanismos incluyen la síntesis de proteínas capaces de hidrolizar antibióticos específicos, al igual que la síntesis de péptidos y mutaciones en regiones específicas de su genoma, que reducen la afinidad de ciertos antibióticos o la ocurrencia de metilaciones, acetilaciones o fosforilaciones que modifican o interfieren en los sitios de unión de proteínas o uniones con el ribosoma <sup>17</sup>.

La tuberculosis (TB) ha adquirido aun mayor importancia en la salud mundial, no solo por causar la muerte de más de 1 millón de personas al año, sino también por la creciente aparición de casos de cepas resistentes a los antibióticos utilizados para tratar la enfermedad <sup>18-20</sup>. La TB es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que generalmente afecta los pulmones y se transmite de persona a persona a través del aire por estornudos, tos o esputo. Se calcula que un tercio

de la población padece de la infección en fase latente pero solo un 3% desarrollará la enfermedad en algún momento de su vida. Para el año 2016 fueron reportados más de 10.4 millones de casos de TB, es decir que cerca de 29 mil personas son diagnosticadas cada día. La TB es la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo, con más de 1.8 millones de muertes por año y casi 5 mil muertes por día. En América Latina se presentaron 270 mil casos de TB, causando 23 mil muertes. En Colombia se registraron más de 13 mil casos, de los cuales el departamento del Atlántico registró 300 casos para el año 2016.

Los regímenes actuales de tratamientos contra TB se basan en el manejo de medicamentos que han sido utilizados por casi 50 años, razón por la cual la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema grave en pacientes con TB. La Tuberculosis Multiresistente (TB-MDR) se genera cuando una cepa de TB presenta resistencia a los dos fármacos de primera línea más importantes (Isoniazida y Rifampicina). Cuando se hace resistente a alguna de las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de los fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, amikacina o kanamicina) se denomina Tuberculosis Extensivamente Resistente (TB-XDR). Esta situación conlleva a elevar los costos de tratamiento y mantenimiento de los pacientes, e incrementa la posibilidad de efectos secundarios <sup>21</sup>.

Teniendo en cuenta que la estreptomicina, extraída de la bacteria *Streptomyces griseus*, fue el primer fármaco usado con éxito para el tratamiento de la tuberculosis, y que las actinobacterias han sido a lo largo de la historia una fuente importante de medicamentos (de las cuales se han obtenido más de 10000 metabolitos bioactivos), se puede asegurar que la megadiversidad biológica de Colombia, incluyendo al departamento del Atlántico, representa una importante área de estudio en la búsqueda de compuestos anti-TB y antibióticos de origen bacteriano.

Esta investigación plantea por primera vez el estudio de la diversidad y el potencial de las bacterias presentes en algunos ecosistemas del departamento del Atlántico; como antecedente para la bioprospección en búsqueda de metabolitos biológicamente activos y su posible uso farmacológico, en especial la búsqueda de metabolitos que actúen contra la



TB. Se busca un registro preliminar de bacterias que muestren actividad biológica de interés para luego estudiar su efecto contra los microorganismos antagonistas *Mycobacterium bovis* BCG, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las bacterias que muestran mejor actividad biológica son descritas fenotípicamente y algunas identificadas molecularmente mediante extracción de ADN, PCR y análisis de secuencia en bases de datos.

## **1. MARCO CONCEPTUAL**

### **1.1. Biodiversidad en Colombia.**

Colombia es el segundo país con mayor biodiversidad en el planeta tierra. Es el primero en aves y orquídeas. El segundo en plantas, anfibios, mariposas y peces dulceacuícolas. Tercero en palmas, reptiles, y cuarto en mamíferos. Se tienen registros de 11269 invertebrados, 292 algas, 1242 líquenes, 1758 hongos y se calcula un total de más de 51300 especies registradas <sup>1,2</sup>. Cifras que demuestran el gran valor y el potencial de los ecosistemas presentes en el país.

Los estudios de diversidad en Colombia, en su mayoría están direccionados a determinar organismos macro, conservación ecológica o mitigación del impacto antrópico en ecosistemas locales. Aun sabiendo que las especies más abundantes del planeta son los microorganismos, de las cuales se calcula que se pueden hallar millones de bacterias en un gramo de suelo, los registros nacionales de especies no van a favor de esta estimación <sup>22</sup>. Por el contrario, las investigaciones están más relacionadas a la descripción de infecciones causadas por bacterias, búsqueda de metabolitos en plantas u organismos marinos <sup>23,24</sup>.

A pesar de la diversidad de ecosistemas en Colombia, el Sistema de Información de Ambiental Marina (SiAM) por la naturaleza de dicha institución, lleva exclusivamente registros de bacterias asociadas a entornos costeros y marinos del país. Estos registros son presentados en la base del sistema de acopio y organización de información del SiAM - INVEMAR <sup>4,25</sup>.

En general es poca la información acerca de investigaciones nacionales sobre el registro de microorganismos, aprovechamiento y su uso. Esto sugiere un gran espacio para la investigación, en cuanto a la búsqueda de microorganismos como las bacterias, su biodiversidad y potencial en bioprospección, específicamente en la búsqueda de metabolitos de interés farmacológico, en los diversos ecosistemas del departamento del Atlántico y del país.

### **1.1.1. Biodiversidad y bioprospección de bacterias en el caribe y el departamento del Atlántico.**

Entre los años de 1990 y 2011, se llevó a cabo un análisis en estudios referentes a la biodiversidad colombiana en 849 revistas, incluidos 5.264 estudios y 72 simposios y conferencias. Este análisis incluye información acerca de taxonomías y filos de Animales (3947 estudios), Plantas (810), Hongos (115), entre otros, y se incluía información del estudio de solo 32 bacterias. Dicho análisis refleja que en más de 20 años, fueron relativamente pocos los reportes e información de estos organismos en el entorno nacional <sup>26</sup>.

Las investigaciones de la biodiversidad de la Región Caribe, mantienen una tendencia similar en cuanto a publicaciones científicas. Entre los años de 1990 a 2017, la revisión sistemática de 470 documentos publicados, indica que los organismos más estudiados en la Región Caribe fueron los Animales (66%), seguido de Plantas (27%) y Microorganismos (7%), con la diferencia de que plantas, insectos, mamíferos y hongos se estudian principalmente en Bosques Seco Tropical, mientras que las bacterias se estudian principalmente en manglares, humedales o ambientes marinos y costeros. De igual forma, los microorganismos como las bacterias, siguen siendo muy poco estudiados en los Ecosistemas de esta región <sup>27</sup>.

El Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) ubicado en la región Caribe, exactamente en la ciudad de Santa Marta en el departamento del Magdalena, cuenta con una colección de bacterias desde el año 2006. Este cepario fue obtenido de sedimentos colectados en áreas costeras de la región Caribe y el Pacífico Colombiano, con la finalidad de encontrar cepas con actividad de biodegradación de compuestos Contaminantes Orgánicos Persistentes. En la actualidad se encuentra conformado por un total de 423 registros biológicos correspondientes a filos de Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacterias, también incluye aislamientos identificados hasta reino Bacterias <sup>4</sup>. Este instituto también adelanta investigaciones a otras aplicaciones en bioprospección con bacterias, pero su sistema de información no lleva un registro documentado veraz de los microorganismos de los ecosistemas marinos o costeros del país <sup>25</sup>. Aunque haya

investigaciones que abarcan territorio marino y costero del departamento del Atlántico, son escasos los registros y bioprospección de bacterias en ecosistemas diferentes a estos ecosistemas.

### **1.1.2. Bosque seco Tropical.**

El bosque seco tropical (BsT) se define como aquella formación vegetal que presenta una cobertura boscosa continua y que se distribuye entre los 0-1000 m de altitud con una temperatura superior a 24°C (piso térmico cálido) y precipitaciones entre los 700 y 2000 mm anuales con uno o dos periodos de sequía al año <sup>28</sup>, clima característico del caribe colombiano.

Se estima que quedan un poco más de un millón de kilómetros cuadrados de BsT en el mundo y aproximadamente el 97% del BsT está amenazado por factores antropogénicos como la fragmentación, la expansión agrícola, la ganadería, las quemas y la minería <sup>29</sup>.

En la actualidad cerca del 95% de los BsT que se distribuían en Colombia se han dedicado a áreas para ganadería, agricultura y fincas de recreo <sup>30</sup>, y sus remanentes dispersos se localizan en pequeños parches desconectados entre sí, en la zona costera y serranías bajas de la región Caribe, en los valles interandinos y en las islas de San Andrés y Providencia <sup>31</sup>.

Este ecosistema amenazado ha perdido la mayor parte de su distribución original en el territorio nacional, sumado a una escasa representatividad en el sistema de áreas protegidas y por un bajo interés por parte de la comunidad científica, que ha enfocado tradicionalmente sus investigaciones en otros ecosistemas como selvas húmedas y páramos. Esta situación crea la necesidad imperiosa de aumentar las actividades de preservación y restauración en las porciones remanentes de bosque seco, pero con una base de información científica, que en muchos casos es escasa o prácticamente nula <sup>32</sup>.

Es entendido que bacterias de suelo, producen metabolitos que se pueden utilizar para combatir enfermedades en humanos y plantas, pero se sabe poco acerca de cómo las

bacterias afectan a comunidades y ecosistemas, donde la diversidad de especies vegetales, la competencia y las presiones por competencia son altas. Se cree que esta competencia, incita a los microorganismos a atacar a sus competidores. Esta situación plantea que la actividad de bacterias disminuye las poblaciones de patógenos de las plantas, lo puede resultar en el desarrollo de moléculas que puedan inhibir microorganismos causantes de enfermedades en humanos <sup>33,34</sup>.

### **1.1.3. Ciénaga del Totumo.**

La Ciénaga del Totumo es considerada un ecosistema compartido entre el municipio de Piojó en el departamento del Atlántico, y Santa Catalina en Bolívar entre los 10°45' y 10°41'N y 75°15' y 75°12' W. Esta comprende un área de 1361,06 ha y es un cuerpo lagunar marino pero también se retroalimenta de arroyos generados por las colinas y cerros cercanos, y su profundidad va desde 0,7 m hasta 1,20 m <sup>35</sup>.

Estuvo conectada al mar caribe, pero el cierre de unas compuertas dispuestas solo permite liberar el exceso de agua de la ciénaga, más no permite lo inverso. Recibe aportes de la Serranía de Piojó en época de lluvia, manteniendo su salinidad en cero. En época seca la salinidad puede aumentar hasta 15 UPS por la vaporización. Su temperatura varía entre 25 y 31°C y la alcalinidad no supera los 100 mg de L-1 <sup>36</sup>.

A pesar de ser un ecosistema convergente con grupos humanos, asociados a actividades de pesca, actividades deportivas, turísticas e industrial <sup>37</sup>, la información que se encuentra acerca de la riqueza ecosistémica de este cuerpo de agua está en su mayoría direccionada a actividades de piscicultura <sup>38,39</sup>.

### **1.1.4. Artrópodos.**

Los artrópodos son un conjunto de invertebrados con exoesqueleto, formado por cutículas, cuyo cuerpo se encuentra segmentado. Es el filo de Animales con mayor número de individuos, y al que pertenecen las clases Insectos, Miriapodos, Arácnidos y Crustáceos <sup>40</sup>.

Los insectos por características tienen 3 pares de patas y antenas, los miriapodos por tener antenas y numerosos pares de patas, los arácnidos carecen de antena y tienen cuatro pares de patas cuyo primer par tiende a tener alguna glándula venenosa y los crustáceos se caracterizan por tener antenas, la mayoría viven en el agua y tener cinco pares de patas de las cuales una de estas se puede transformar en pinza <sup>41</sup>.

Entre los insectos se encuentran por ejemplo los mosquitos, cucarachas, mariposas, avispas, abejas, hormigas, termitas, etc. Entre los miriapodos están los ciempiés y milpiés. Entre los arácnidos todas las arañas y entre los crustáceos, camarones, cangrejos, langostinos, etc <sup>40</sup>.

La diversidad y éxito evolutivo de algunos artrópodos ha dependido en parte de su capacidad de relacionarse con microorganismos beneficiosos. Los hallazgos de simbiosis, muestran notables comportamientos entre comunidades intestinales microbianas e insectos, en el que las bacterias pueden proporcionar una gran variedad de beneficios, como el de mejorar la nutrición mejorando sus dietas pobres en nutrientes, ayudando en la digestión de componentes alimenticios recalcitrantes y protección contra parásitos u otros patógenos <sup>42,43</sup>.

## **1.2. Bacterias productoras de metabolitos de interés farmacológico.**

### **1.2.1. Actinobacterias.**

Las actinobacterias o actinomicetos son un filo y clase perteneciente al dominio Bacteria. Son gram positivas y particularmente han sido fuente importante para el desarrollo de antibióticos, como la estreptomicina, actinomicina, vancomicina, eritromicina, entre otros (Tabla 1) <sup>44,45</sup>.

Estos organismos son ubicuos y se distribuyen ampliamente en hábitats acuáticos y terrestres, incluidos hábitats extremos, como sedimentos de aguas profundas o suelos desérticos hiperáridos. Además son comunes en el suelo, en funciones de degradación de materia orgánica y moléculas recalcitrantes orgánicas <sup>11-13</sup>. Estos microorganismos

aportan en gran medida al porcentaje en la producción de metabolitos conocidos contra bacterias patógenas <sup>10</sup>. Lo que resalta la importancia farmacológica de estos y más con el creciente problema de la multi-resistencia antibiótica de patógenos que cada vez se hacen más difíciles de controlar <sup>15</sup>.

Las actinobacterias abarcan 15 órdenes, 43 familias y 203 géneros. Los miembros del taxón muestran una notable gama de morfologías, que incluyen organismos que forman cocos (por ejemplo, *Dermacoccus* y *Micrococcus*), barras cortas (*Mycobacterium* y *Tropheryma*), varillas irregulares (*Mycetocola*), varillas y cocos (*Arthrobacter* y *Brevibacterium*), y micelios que se fragmentan en coccoides y elementos similares a vástagos (*Nocardia* y *Oerskovia*) <sup>13</sup>.

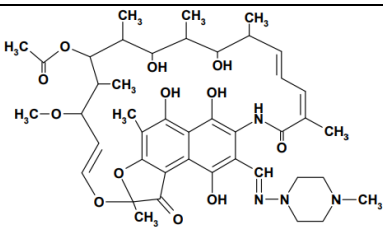
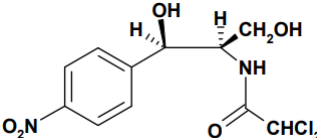
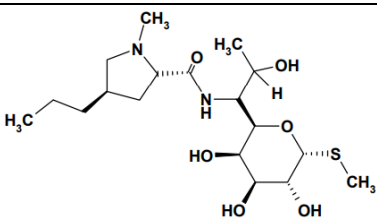
Otros muestran una diferenciación morfológica más extensa que van desde aquellos que producen hifas de sustrato extensamente ramificadas que transportan esporas (*Micromonospora*) o vesículas de esporas (*Actinoplanes* y *Dactylosporangium*) hasta las que forman filamentos o un micelio ramificado estable que lleva hifas aéreas que se diferencian en cadenas cortas o largas de esporas (*Actinomadura* y *Streptomyces*) o en vesículas de esporas (*Planobispora* y *Streptosporanigium*) <sup>46</sup>.

Entre los procariotas, las actinobacterias, particularmente las cepas del género *Streptomyces*, son la fuente más rica de productos naturales, especialmente antibióticos clínicamente útiles, agentes antitumorales, antifúngicos, antivirales, entre otras. Se estima que de las *Streptomyces* que representan el 45% de la población de actinobacterias, el 80% de los metabolitos secundarios producidos son bioactivos, o sea cerca de 10000 del total de compuestos que se conocen hoy en día, son producidos por *Streptomyces* <sup>47-50</sup>. A pesar de la increíble diversidad metabólica y del número total de productos naturales que pueden ser sintetizados por estos microorganismos, se estima que solo el 10% han podido ser descubiertos <sup>14</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinobacterias, sitio de acción y estructura química<sup>10</sup>.

CLASIFICACIÓN	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
<b>β-Lactámicos</b>	<b>Cefoxitina.</b> (Cefamicina semisintética). Inhibe síntesis de pared celular.	
<b>Aminoglucósidos</b>	<b>Estreptomicina.</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
<b>Tetraciclinas</b>	<b>Tetraciclina</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
<b>Macrólidos</b>	<b>Eritromicina</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S.	
<b>Polienos</b>	<b>Amfotericina B</b> Alteración de permeabilidad en la membrana.	
<b>Glicopéptidos</b>	<b>Vancomicina</b> Inhibe síntesis de pared celular.	



<b>Rifamicinas</b>	<b>Rifampicina</b> Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa.	
<b>Fenicoles</b>	<b>Cloranfenicol</b> Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.	
<b>Azúcares</b>	<b>Lincomicina</b> Inhibe síntesis de Unión en la subunidad complejos proteínas. 50S.	

### 1.2.2. Bacterias simbiotes de artrópodos.

Las bacterias simbiotes se conocen como aquellas que mantienen una asociación física cercana con un organismo diferente de su especie. Estas son capaces de vivir dentro organismos superiores sin generar algún tipo de daño<sup>51</sup>. Se ha demostrado que algunos metabolitos secundarios de microorganismos simbiotes de insectos, tienen propiedades farmacéuticas o compuestos con características únicas. Lo que puede convertir a la interacción entre bacteria-huésped en una estrategia en la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicamente útiles<sup>51</sup>.

Puede que estas interacciones entre especies hayan surgido de manera evolutiva como mecanismos de adaptación o defensa, pues se ha demostrado que los insectos que actúan como hospederos, que por su alimentación están propensos a la infestaciones por patógenos, han desarrollado como respuesta a estas amenazas diferentes mecanismos de defensa en la que se incluye el uso de metabolitos secundarios bioactivos producidos por microorganismos mutualistas<sup>52</sup>.

### 1.2.3. Bacterias endófitas.

Las bacterias endófitas son organismos que viven dentro de tejidos de plantas vivas sin

causar enfermedad o síntoma al hospedero <sup>53</sup>. Se han reportado en plantas medicinales, maleza, ornamentales, frutales, entre otros. Los endófitos ingresan a la planta principalmente a través de las raíces, pero también por las hojas, flores o tallos y se pueden diseminar por el resto de la planta huésped <sup>54</sup>.

Es sabido que los endófitos son promotores de crecimiento y desarrollo de la planta, y aumentan la resistencia del huésped contra patógenos <sup>55,56</sup>. Además se han descubierto que los endófitos producen una amplia de metabolitos biológicamente activos, como antimicrobianos, anticancerígenos, antivirales, antioxidantes, entre otros <sup>57-60</sup>.

Las bacterias de suelos han sido hasta ahora fuente importante de la mayoría de antibióticos. No obstante se sabe poco acerca de Bacterias Endófitas capaces de producir antibióticos además de otros productos naturales, y pueden ser una alternativa prometedora para la búsqueda de nuevos antibióticos. Ejemplo de ello es el descubrimiento de nuevos antibióticos como las ecomicinas, pseudomicinas, munumbicinas, kakadumicinas, producidos por bacterias endófitas <sup>61</sup>.

La especie neotropical *Piper marginatum*, Piperaceae, se encuentra ampliamente distribuida en la región el Caribe colombiana y está presente en el Bosque Seco Tropical <sup>62,63</sup>. Esta ha sido utilizada por culturas indígenas tradicionales por las propiedades medicinales de la planta. Análisis de la fitoquímica de la planta han demostrado interesante actividad antibacterial, antifúngica, antitumoral, hemostáticos, entre otros <sup>64-66</sup>. Partiendo de dichas propiedades, las bacterias endófitas de esta planta, podrían ser una fuente importante en la búsqueda de moléculas de interés farmacológico.

### **1.3. Tuberculosis.**

#### **1.3.1. ¿Qué es la tuberculosis?**

Las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* son la causantes de la TB. Las cepas que más representan este complejo son *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, entre otras <sup>67</sup>. Se calcula que alrededor de una tercera parte de la población humana tiene TB latente <sup>68</sup>. La TB latente se define por la ausencia

de los síntomas clínicos característicos, pero conlleva el riesgo de la progresión y posterior manifestación de la enfermedad <sup>69</sup>. Esta constituye un problema mundial de salud pública cuya situación es crítica en países desarrollados y en vía de desarrollo, debido principalmente a fallas en las medidas de control, seguimiento y tratamiento de esta enfermedad <sup>70</sup>. La TB no es un flagelo reciente. Se tienen registros de esta enfermedad en tumbas de Egipto que datan de 1500 a 3000 AC <sup>71-73</sup> al igual que en momias en Perú de 1000 a 1300 AC <sup>74</sup>.

*M. tuberculosis* es una bacteria patógena con forma de bacilo, aeróbica, de crecimiento lento, considerada Gram positiva, descubierta por Robert Koch en 1882 <sup>75</sup>. Tiene una cubierta inusual que cubre su superficie celular con alto contenido lipídico (ácido micólico principalmente) responsable de su alta resistencia a agentes químicos, siendo de utilidad para la tinción diagnóstica de Ziehl-Neelsen <sup>76-79</sup>.

Una vez introducida en los pulmones, *M. tuberculosis* es absorbida por macrófagos alveolares, incapaces de digerirla, debido a varios mecanismos mediados por proteínas, como el bloqueo del autoantígeno endosomal precoz 1 (EEA1), que evitan la fusión del fagosoma con el lisosoma cuyo interior contiene factores antibacterianos <sup>80</sup>. Estos mecanismos permiten a la bacteria multiplicarse dentro del macrófago. El éxito de la patogenicidad de *M. tuberculosis* se le atribuye a su capacidad de persistir en los tejidos del huésped, donde los fármacos utilizados para combatirlo requieren una administración prolongada para lograr efectos de consideración, contrario a la intermitencia de los tratamientos contra TB que genera una latencia y un foco expectante de contagio <sup>81</sup>. Algunos estudios en genética han ayudado a comprender funciones específicas en los genes de *M. tuberculosis* con respecto a los factores de virulencia y patogénesis, donde se ha descubierto que muchas proteínas secretadas e importadas son importantes en la patogénesis y que las cepas resistentes *M. tuberculosis* han desarrollado resistencia a muchos fármacos de TB debido a las mutaciones en sus genes <sup>82</sup>.

Para el tratamiento de TB se utilizan fármacos denominados de primera línea, en los que se incluyen isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) <sup>83</sup>.

Una cepa de *M. tuberculosis* se vuelve multirresistente (TB-MDR) cuando es resistente a Isoniazida y Rifampicina, siendo estos dos últimos los antituberculosos más potentes entre los fármacos de primera línea. Esto se puede deber a la interrupción del tratamiento de TB que debe estar regido a mínimo 6 meses de tratamiento exhaustivo <sup>19,84,85</sup>. El tratamiento para TB-MDR se vuelve cada vez más difícil, debido a lo costoso del tratamiento y la limitación del uso de los mismos que generalmente son difíciles de encontrar y sus efectos secundarios son más severos. También existen cepas con mayor nivel de resistencia como la TB extensivamente resistente (TB-XDR) que se presenta cuando la TB es resistente a la Isoniazida, Rifampina, a alguna de las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de los medicamentos inyectables de segunda línea (Amikacina, Kanamicina o Capreomicina) <sup>19,86</sup>.

### **1.3.2. Epidemiología**

La TB es una pandemia global que constituye la principal causa de muerte en el mundo por enfermedad infecciosa, donde casi un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso pero solo un porcentaje menor desarrollará la enfermedad <sup>18</sup>. Alrededor de 10.4 millones de casos se reportan cada año por tuberculosis, y cada día más de 28 mil personas son diagnosticadas con la enfermedad. Por año causa 1.8 millones de muertes y se estima que cada día mueren casi 5 mil personas a causa de la tuberculosis <sup>18</sup>. Existe el 10% de riesgo de que personas infectadas con *M. tuberculosis* enfermen de TB a lo largo de su vida, a diferencia de personas inmunodeprimidas, fumadores, diabéticos y VIH positivos que tienen mayor riesgo de enfermar <sup>87</sup>. La TB es una enfermedad cosmopolita que para el año 2015 presentó el mayor número de casos en Asia, seguida de África. Se estimaron 1.2 millones de nuevos casos de TB/VIH correspondientes a casi tres cuartas partes de la Región del África, con una carga de incidencia que duplica el promedio mundial de 133 casos por cada 100000 habitantes, con 281 casos. China, India e Indonesia registraron el mayor número de casos para Asia y el Pacífico Occidental <sup>18,87</sup>.

Para el año 2015 desarrollaron TB-MDR unas 480.000 personas a nivel mundial <sup>87</sup>, debido a que las cepas de *M. tuberculosis* han desarrollado resistencia a fármacos de primera

línea, convirtiéndose en un riesgo aún más latente para la salud pública en el mundo <sup>20,21</sup>. La TB-XDR aparece como una amenaza seria para la salud pública, identificada en 6 continentes y se asocia a resultados de tratamientos mal llevados de TB-MDR <sup>20</sup>, llevándonos al uso racional de fármacos de primera y segunda línea, y a la búsqueda de nuevas opciones para combatir la TB.

Los casos incidentes por TB varían en relación al tamaño de la población de un determinado país y su desarrollo. Las tasas más bajas predominan en países con altos ingresos, incluidos la mayoría de países de Europa Occidental, Australia, Nueva Zelanda, Canadá y Estados Unidos, donde la incidencia es menor de 10 casos por cada 100.000 habitantes<sup>18</sup>. En América la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaron que para el año 2015 se presentaron 270 mil casos de TB, causando la muerte 23 mil personas cada año. Brasil, Perú, México y Haití representaron el 61% de casos de TB para América <sup>88</sup>. En Colombia en el año 2016 se registraron un total de 13.467 casos notificados de TB según el perfil de tuberculosis en Colombia de la OMS. El departamento del Atlántico ocupó el puesto 13, donde se registraron 300 casos el mismo año <sup>89</sup>.

### **1.3.3. Diagnóstico**

Generalmente la transmisión de TB se presenta vía aérea, y requiere de contacto prolongado con personas con la enfermedad. Además influyen otros factores como el nivel de afectación de una persona enferma, ya sea por la intensidad en la tos y esputo con alta cantidad de bacilos tuberculosos, o también por el grado y la duración de exposición frente a una persona infectada, ya que aumenta el riesgo de contraer la enfermedad <sup>90,91</sup>.

Los pacientes con TB presentan generalmente dificultad respiratoria, tos progresiva a veces con sangrado, pérdida de peso, fiebre, sudoración excesiva de noche, dolor en el tórax, fatiga y debilidad <sup>87</sup>. La radiografía de tórax posterior-anterior se utiliza para determinar anomalías o lesiones en el tórax o pulmones, que pueden verse alterados en cuanto a forma, tamaño, densidad. La TB puede ser la causa de estas anomalías

radiográficas pero no permite un diagnóstico confirmado, por consiguiente se recurre a la técnica de intradermorreacción o Mantoux <sup>92</sup>, o la técnica más moderna conocida como TB-Elispot o interferón gamma reléase assay (IGRA).

La prueba de tuberculina PT es una prueba estándar para el diagnóstico de TB, que consiste en un extracto filtrado, concentrado y esterilizado del cultivo de bacilos tuberculosos o el antígeno PPD (derivado puro de proteínas de *M. tuberculosis*). Esta práctica se emplea por técnica de Mantoux, inyectando en la cara ventral del brazo 0.1 mL de PPD. Este contiene proteínas comunes de *M. tuberculosis*, la vacuna de *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) y otras bacterias no tuberculosas, que confiere especificidad a la PT y una respuesta de hipersensibilidad mediada por linfocitos T a la persona infectada por *M. tuberculosis*. Pasadas 48-72 horas aparece una inflamación en la zona de la inyección y se debe medir en milímetros el diámetro transversal de la inflamación según el eje longitudinal del brazo. Si no existe inflamación sino únicamente enrojecimiento se interpreta como 0mm, y positiva sí es mayor a 5mm con inflamación. No se necesita repetir la PT si se cuenta con una prueba previa positiva. Generalmente no se observa PT positiva hasta pasados 6 meses de vida <sup>93,94</sup>. Aunque la PT sigue siendo utilizada, presenta algunas limitaciones como baja sensibilidad en personas inmunocomprometidas pero mayormente por su reactividad cruzada con pacientes vacunados con BCG, provocando falsos negativos o interpretaciones subjetiva del resultado <sup>94</sup>.

Actualmente se han desarrollado técnicas de laboratorio para el diagnóstico de TB basadas en el interferón gama en sangre IGRA (interferon gamma release assay), una citokina primordial en el control de TB que es liberada al estímulo *in vitro* de células T sensibilizadas con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Se emplea el estímulo de linfocitos T de la región genética RD1: ESAT-6 (early secretory antigen target 6) y CFP-10 (culture filtrate protein-10) y el antígeno de la región RD11:RV2654, presentes en el complejo *M. tuberculosis* pero ausente en BCG y la mayoría de micobacterias. Las IGRA presentan ventajas sobre PT por su objetividad, repetición factible, fácil estandarización y aplicabilidad pero resultan mucho más costosas <sup>94-96</sup>.

En cuanto al diagnóstico por microbiología, se realiza una baciloscopía, que consiste en un frotis de esputo para determinar la presencia de AFB (Acid-fast bacillus) o Bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). A pesar de ser una técnica rápida no es 100% específica ya que requiere alta cantidad de bacilos tuberculosos y algunas de las BAAR puede que no sean se *M. tuberculosis*, por lo tanto se requiere del cultivo selectivo para confirmar la presencia de TB <sup>92</sup>.

#### 1.3.4. Tratamiento

La TB se puede tratar si se administran de manera correcta y exhaustiva medicamentos aprobados por la FDA durante 6-9 meses, tales como, isoniazida INH, rifampicina RIF, etambutol EMB y pirazinamida PZA <sup>83</sup>. Además, se recurre a un método denominado esquema posológico para la TB durante una fase inicial de dos meses, seguida de una fase que continúa con la elección de distintas opciones de tratamiento que va desde los 4 a 7 meses <sup>86</sup>. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Esquema posológico de tratamiento contra Tuberculosis.

<b>Esquema posológico preferido</b>	
<b>Fase inicial:</b>	<b>Fase de continuación:</b>
INH, RIF, PZA y EMB*: 5-6 dosis diarias (8 semanas)	INH y RIF: 126 dosis diarias (18 semanas) o INH y RIF: 36 dosis, dos veces a la semana (18 semanas)
<b>Esquema posológico alternativo:</b>	
<b>Fase inicial:</b>	<b>Fase de continuación:</b>
INH, RIF, PZA y EMB*: 14 dosis diarias (2 semanas), luego 12 dosis, dos veces a la semana (6 semanas)	INH y RIF: 36 dosis, dos veces a la semana (18 semanas)
<b>Esquema posológico alternativo:</b>	
<b>Fase inicial:</b>	<b>Fase de continuación:</b>
INH, RIF, PZA y EMB*: 24 dosis, tres veces a la semana (8 semanas)	INH y RIF: 54 dosis, tres veces a la semana (18 semanas)
*Se puede discontinuar el EMB si los estudios de sensibilidad a los medicamentos demuestran sensibilidad a los medicamentos de primera línea <sup>86</sup> .	

Adicionalmente, se prosigue con una fase de continuación y finalización del tratamiento. Para la fase de continuación administrada en 7 meses solo se recomienda a pacientes con lesiones cavernosas pulmonares causadas por la TB donde cuyo cultivo en esputo es positivo a los 2 meses de haber terminado el tratamiento, pacientes cuya fase inicial del tratamiento no incluyó Pirazinamida y pacientes tratados con Isoniazida y Rifampicina una vez por semana cuyo cultivo por esputo sea positivo al terminar la fase inicial del tratamiento. La fase de finalización del tratamiento es determinada por la cantidad de dosis administradas durante un determinado periodo <sup>86</sup>.

Para el tratamiento de la TB-MDR de deben emplear un mínimo de cuatro principios potencialmente activos en las que se deben incluir todas los medicamentos de primera línea, una fluoroquinolona, y un inyectable durante al menos 6 meses, pasando a fase de continuación (sin inyectable), manteniendo el tratamiento durante mínimo 18 meses hasta que se obtenga un aislamiento negativo en cultivo de TB <sup>1,97</sup>.

### **1.3.5. Tuberculosis resistente**

La resistencia de los medicamentos utilizados para tratar la tuberculosis se convirtió en un problema desde el inicio de la era de quimioterapias. Desde el inicio de los 90 la Tuberculosis Resistente a Múltiples Drogas o TB-MDR se ha presentado en todos los continentes del planeta tierra <sup>18,98</sup>.

Las principales razones por las que la resistencia de la TB a múltiples medicamentos continúa, se debe a mala gestión de los tratamientos y por la facilidad de transmisión. Además de la dificultad de algunos países en vía de desarrollo de suministrar de manera eficaz los medicamentos contra TB-MDR, por dificultades en la disponibilidad y por los efectos adversos que presentan los pacientes, razones que hacen susceptible a que aparezca la Tuberculosis Extensamente Resistente o TB-XDR. La OMS calcula que para el año 2016, aproximadamente casi medio millón de personas en el mundo desarrollaron TB-MDR. Además, también estimó que los países con mayor número de población como China, India y Rusia, presentan altos casos de TB-XDR <sup>19</sup>.



Se estima que de 480000 casos de TB-MDR, aproximadamente el 10% pasa a ser TB-XDR, con resistencia adicional a alguno de los medicamentos de primera o segunda línea o totalmente resistentes a los medicamentos de ambas líneas, casos que recientemente han sido descritos como Tuberculosis Totalmente Resistente TB-TDR<sup>99</sup>.

Aunque la TB es curable, siguen siendo alta la tasa de mortalidad de TB-MDR con alrededor del 40% y 60 % para TB-XDR <sup>100</sup>. Razón que hace necesaria la confrontación de la Tuberculosis fármaco-resistente, previniendo la transmisión o contribuyendo con herramientas y nuevos medicamentos contra una enfermedad cuya velocidad de resistencia contra la hace cada vez más difícil de combatir.

#### **1.4. Antibióticos**

Las infecciones microbianas están descritas desde el antiguo Egipto, Grecia y China. Con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 comenzó la era moderna de los antibióticos, que desde entonces han transformado la medicina y salvado millones de vidas<sup>101</sup>. Los antibióticos son compuestos antimicrobianos de origen natural, provenientes de bacterias u hongos cuya función es matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Aunque de los miles de antibióticos descubiertos, solo aproximadamente el 1% tiene aplicación en medicina, debido a su toxicidad o poca captación de los hospederos, sin embargo los antibióticos que se emplean en medicina han tenido un impacto importante en el tratamiento de enfermedades infecciosas<sup>9</sup>.

En 1940, con la industrialización de la producción de la penicilina, se prescriben antibióticos por primera vez para el tratamiento de infecciones graves. La penicilina tuvo gran éxito en el control de infecciones bacterianas entre soldados de la Segunda Guerra Mundial, seguido de la rapidez y el éxito de los aislamientos y desarrollo de gran cantidad de agentes antimicrobianos, en los que se incluyen algunas de las principales clases de antibióticos en uso hasta hoy día (tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, cefalosporinas, cloranfenicol, glicopéptidos y rifamicinas) <sup>102,103</sup>.

Los agentes antimicrobianos se clasifican por mecanismo de acción, espectro de acción, estructura molecular. Estos se dividen en agentes sintéticos, que se producen en un laboratorio, semisintéticos, obtenidos a partir de microorganismos para posterior modificación química y antibióticos, que son de origen netamente microbiológico <sup>9,104</sup>. Los antimicrobianos varían significativamente respecto a su actividad contra bacterias debido a la naturaleza de estas, sea por la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, o por inhibir el procesamiento de aminoácidos o azúcares del medio externo, necesarios para la biosíntesis de membranas o paredes celulares (Tabla 3). Algunos actúan contra bacterias Gram positivas, otros contra Gram negativas o sobre ambas dependiendo de la sensibilidad o resistencia de la bacteria, de donde se deriva la extensión del espectro de un antibiótico que puede ser amplio o reducido <sup>105</sup>.

**Tabla 3.** Clasificación de los antibióticos y mecanismos de acción.

<b>Mecanismo de acción:</b>	<b>Ejemplos:</b>
<b>Inhibición de la síntesis de la pared celular</b>	Penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina, nafcilina
<b>Daño a la membrana plasmática</b>	Polimixina, nistatina, anfotericina B
<b>Inhibición de la síntesis de proteínas</b>	Aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina
<b>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</b>	Rifamicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina
<b>Antimetabolitos</b>	Trimetoprim, sulfonamidas
<b>Inhibidores de betalactamasas</b>	Sulbactam, clavulanato, tazobactam
<b>Antifímicos</b>	Etambutol, pirazinamida, isoniazida, estreptomicina, rifampicina

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general:

Estudiar la diversidad y el potencial anti-micobacteriano y antibacterial de extractos de las bacterias de ecosistemas del departamento del Atlántico (Colombia).

## **2.2. Objetivos específicos:**

- Aislar bacterias obtenidas de ecosistemas del departamento del Atlántico, con potencial antibacteriano, mediante el desarrollo de un medio de cultivo no convencional.
- Desarrollar protocolos para el aislamiento y cultivo de bacterias de diferentes ecosistemas del departamento del Atlántico.
- Evaluar la actividad anti-micobacteriana frente a la cepa *Mycobacterium bovis* BCG como un método cualitativo de pre-validación contra cepas patógenas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Evaluar la actividad anti-bacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, de los extractos que mostraron actividad anti-micobacteriana por un método de pre-validación cuantitativo.
- Conocer las características fenotípicas de los aislamientos obtenidos y la taxonomía molecular de algunas de las bacterias que presentaron actividad anti-micobacteriana.

## **3. METODOLOGÍA.**

### **3.1. Recolección de muestras de diferentes ecosistemas:**

Se recolectaron muestras al azar en diferentes sitios en los que se incluyen muestras de suelo de Bosque Seco Tropical (BsT), sedimento de la Ciénaga del Totumo, interior de artrópodos del campus de la Universidad del Norte (Termitas, Ciempiés, Milpiés, Cucaracha común) y la raíz de la planta piperaceae *Piper Marginatum* colectada en el BsT, en el departamento del Atlántico colombiano. Las muestras se recolectaron, se trasladaron y se procesaron en el laboratorio en el menor tiempo posible.

#### **3.1.1. Obtención de los aislamientos**

Las muestras de suelo de Bosque Seco Tropical, al igual que la muestra de sedimento de la Ciénaga del Totumo fueron tomadas teniendo en cuenta el “Método estándar para la evaluación de la biodiversidad del suelo y las prácticas de uso de la tierra” <sup>106</sup>, obteniendo una muestra compuesta, con aproximadamente 300g de suelo, colocados en una bolsa plástica estéril para inmediatamente ser transportadas y procesadas en el laboratorio.

La muestra de suelo de BsT fue extraída de una porción de BsT perteneciente a la Universidad del Norte con ubicación en las coordenadas 11°01'05"N 74°51'04"O. La muestra de sedimento de la Ciénaga del Totumo, se extrajo en cercanías al Volcán de lodo que lleva el mismo nombre, en las coordenadas 10°44'40"N 75°14'29"O <sup>107</sup>.

La muestra de la raíz de la planta piperaceae *Piper Marginatum*, fue obtenida de la un porción de BsT presente en la Universidad del Norte y las muestras de los artrópodos, fueron obtenidas de artrópodos presentes en el campus universitario de la misma.

Todas las muestras procesadas en el menor tiempo posible de la toma de origen, y fueron tratadas de manera independiente dentro de cabina de flujo laminar estéril, con lavado exterior previo a la obtención de la muestra inicial o muestra 0.

### **3.2. Medios de cultivo:**

A pesar del gran número de microorganismos que han sido identificados, descritos y analizados, el 90 % de ellos siguen siendo incultivables <sup>108</sup>. Para lograr aislar bacterias de crecimiento no convencional con especial interés en la producción de metabolitos de uso farmacológico, y sobre todo evitar los altos costos que implican la compra de medios de cultivos especializados, se acude la búsqueda bibliográfica o modificaciones de medios y métodos reportados, en los cuales se trata de remplazar los componentes de estos y simular las condiciones y disponibilidad de nutrientes <sup>109,110</sup>.

Este método de cultivo busca de manera sencilla y a bajo costo, encontrar cepas de interés xenobiótico, empleando elementos al alcance de un laboratorio convencional (Tabla 4).

### **3.3. Purificación de aislamientos:**

Las colonias que presentaron características de interés particular en placa, fueron repicadas en medio BM (tabla 4), para garantizar la presencia única de la colonia a aislar. Pasado el tiempo necesario de incubación de cada aislamiento, se verificó la obtención de una única colonia, y su posterior repique a caldo nutritivo para mejor recuperación y mayor tiempo de conservación del cultivo. Los cultivos puros se preservaron mediante ultracongelación a -80°C, en caldo de peptona con glicerol al 50% como criopreservante.

### **3.4. Preparación de extractos:**

Se prepararon cultivos de 20mL de medio Caldo Nutritivo en tubos cónicos de 50mL, con inóculos de las bacterias de interés en condiciones favorables de crecimiento, de donde se obtuvieron los extractos acuosos de las bacterias. Estos se incubaron a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en agitación a 200 rpm (revoluciones por minuto), entre 5 y 10 días. Pasados los días ya es visible la modificación de la tonalidad del caldo de algunos inóculos, luego el medio fermentado se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos de manera fraccionada en tubos cónicos de 50 mL. El sobrenadante (extracto acuoso bruto) fue separado de la biomasa, en cabina de flujo laminar. El pellet fue descartado, obteniendo el extracto acuoso con los metabolitos bacterianos.

### **3.5. Actividad antimicrobiana:**

Los extractos brutos acuosos se evaluaron basados en un bioensayo tipo “Spot culture growth inhibition assay” (SPOTi), en el cual se realiza una mezcla, a una concentración de V/V de 1ml de extracto bacteriano / 10mL del medio agar Middlebrook 7H10, apropiadamente suplementado con glicerol y ADN<sub>NaCl</sub> (Albúmina, Dextrosa y Cloruro de Sodio), ideal para el crecimiento de Micobacterias. Se sirven 10mL en cajas de Petri de 100mm y posterior a la solidificación del medio de cultivo, se realizó la siembra de *M. bovis* BCG. Cabe mencionar que la cepa de *M. bovis* BCG había sido repicada con anterioridad en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado, a 37°C y agitación a 200 rpm, que se

encontraba en fase log (8 días de crecimiento).

Se realiza una dilución típica de la cepa hasta  $10^3$ , y de esta se agregan 10  $\mu$ L del inóculo en tres partes diferentes de la superficie del agar en placa de Petri (Figura 9). De igual manera se mantuvo una placa control solo con el medio 7H10 suplementado, y una placa control positivo, con los mismos volúmenes de medio de cultivo en la placa, la misma cantidad y forma se siembra de la cepa *M. bovis* BCG. Este ensayo se hizo por duplicado.

Para probar la inhibición de los extractos acuosos contra las cepas *E. coli* y *S. aureus*, se acudió al método por dilución en placas de 96 pozos y lectura de Densidad Óptica (DO) por longitud de onda a 660nm en lector de microplacas en intervalos de tiempo de 2 horas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 h) en lector de placas multipozos BMG Labtech, FLUOstar Omega.

Teniendo en cuenta la capacidad de volumen de cada pozo (200 $\mu$ L), se realizaron ensayos por triplicado, en el que se tomaron 1000  $\mu$ L de medio caldo nutritivo y se mezclaron con 100  $\mu$ L del extracto acuoso para mantener una relación de 1/10, V/V. Luego, cada una de las mezclas, se inoculó con 1  $\mu$ L de la cepa a evaluar, (*E. coli* o *S. aureus*) que habían sido crecidas con 24 horas de anterioridad en un volumen de 10 mL de caldo de cultivo nutritivo en tubos cónicos a 37°C con agitación a 200 rpm.

Del mismo modo se mantuvo por triplicado, control negativo (medio sin inóculo), control de crecimiento (medio con inóculo de bacterias a evaluar) y controles positivos (medio con inóculo de la cepa en presencia de antibiótico Cloranfenicol a una concentración de 10mg/mL), (Clinical and Laboratory Standard Institute – CLSI <sup>111</sup>).

Los porcentajes de crecimiento se midieron de acuerdo a la Ecuación **A**. Los extractos se consideraron activos si mostraban una inhibición del crecimiento del 50% de acuerdo a la Ecuación **B** <sup>112</sup>.

$$\% \text{ de Crecimiento} = \frac{(DO_{\text{Tratamiento}} - DO_{\text{Blanco}})}{DO_{\text{Control positivo}}} \times 100 \quad (\text{A})$$

% de Inhibición = 100 – % de Crecimiento

(B)

### **3.6. Identificación Molecular:**

#### **3.6.1. Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo:**

A partir de los aislamientos bacterianos purificados de las muestras obtenidas, cada aislamiento fue mantenido por crio-preservación en medio de peptona con glicerol al 50% a -80°C.

Para las condiciones de cultivo de los aislamientos, se inocularon en tubos cónicos de capacidad de 50 mL, que contenían 10 mL de medio nutritivo, incubados a temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  aprox.), en agitación a 200 rpm, entre 5 y 10 días máximos, dependiendo de la cantidad de biomasa generada por cada aislamiento.

#### **3.6.2. Extracción de ADN:**

La extracción se realizó con ayuda de un kit comercial DNA Land Scientific<sup>TM</sup>, siguiendo los pasos del protocolo, con el cual se extrajo y purificó el ADN de las células bacterianas. La calidad del ADN extraído fue verificada por espectrofotometría calculando la relación de las absorbancias a 260/280 nm (Nano Drop<sup>TM</sup>), para determinar la confirmación de la extracción y la calidad del ADN, previo a la amplificación por PCR.

#### **3.6.3. PCR:**

El ADN extraído se amplificó utilizando un kit comercial de PCR específico para la “Cepa de Interés Xenobiótico” la cual se siguieron las instrucciones del fabricante<sup>113</sup>. Este método incluye tres etapas:

- a) amplificación del gen a partir de la muestra extraída. La amplificación del ADNr 16S se consigue en un termociclador, y como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro de la bacteria;

- b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y
- c) análisis de la secuencia.

#### **3.6.4. Análisis de secuencias:**

La secuencia de ADN obtenida se comparó con las bases de datos existentes de libre acceso como NCBI (National Center for Biotechnology Information) - BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)<sup>114</sup>.

#### **3.6.5. Características fenotípicas:**

La selección de los aislamientos se determinó por las características fenotípicas en placa de las siembras iniciales de cada una de las muestras. Para la colección se tuvo en cuenta las características morfológicas macroscópicas de crecimiento en placa, tales como textura, formación de micelio aéreo, producción de pigmento, tratando de no repetir colonias, verificando características distintivas de cada aislamiento tomado (Figura 1).

### **4. Resultados.**

#### **4.1. Medio, condiciones de cultivo y extracción de bacterias del medio natural de ecosistemas del atlántico.**

El diseño del medio de cultivo, tiene como base filtrado líquido de compost de origen orgánico. Además tiene agar de repostería como agente solidificante, L-arginina, suplemento de dieta, que actúa como fuente de nitrógeno, almidón como fuente de carbono, extracto de levadura como enriquecedor de nutrientes, jarabe Wintomylon® que contiene 50 mg/mL de ácido nalidíxico que disminuye el crecimiento de bacterias gram negativas y jarabe Labinco® que contiene 33mg/mL de Nistatina, para disminuir la proliferación de hongos.

El medio es sometido a condiciones convencionales de autoclave para su esterilización y al dejar en reposo, es suplementado en condiciones asépticas con macerado líquido en



agua estéril de pastillas de multivitamínico Centrum®. Cabe resaltar que todos los elementos empleados en la elaboración de este medio de cultivo, son de fácil acceso y manejo, evitando los altos costos que conlleva la compra de medios de cultivos selectivos o especializados. Este medio se denominó medio de cultivo **BM** “Bernal Martínez” (Tabla 4)<sup>115-118</sup>.

**Tabla 4.** Medios utilizados

Medio de cultivo	Composición
<b>Agar BM</b>	L-arginina 1.0 g, almidón 1.0, nistatina 3.0 mL, ácido nalidíxico 1.0 mL, vitamina Centrum® 1.0 g, agar 25.0 g, 1.0 g de extracto de levadura, en 1000 mL de agua de humus (extraída de suelo de lombricompost)
<b>Caldo BM</b>	L-arginina 1.0 g, almidón 1.0 g, nistatina 3.0 mL, ácido nalidíxico 1.0 mL, vitamina Centrum® 1.0 g, 1.0 g de extracto de levadura, en 1000 mL de agua de humus
<b>Agar nutritivo AN</b>	Medio nutritivo polvo 10.0 g, agar 25.0 g en 1.0 L de agua
<b>Caldo nutritivo CN</b>	Medio nutritivo polvo 10.0, g en 1.0 L de agua

\*pH entre 7 - 7,3.

Se realizó la incubación de las muestras en el medio Agar **BM** a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5-10 días. Pasado el tiempo se observaron las cajas de Petri en busca de colonias con morfología interesante (similares a actinobacteria), que presentaron coloración o halos de inhibición. Se repicaron en medio Caldo **BM** fresco hasta asegurar la pureza del inóculo.

## 4.2. Extracción de bacterias de diferentes ecosistemas.

### 4.2.1. Protocolo para extracción de bacterias de suelo y de sedimentos de ciénaga.

Luego de la toma de las muestras, para la extracción de bacterias de suelo y sedimento, se estableció el siguiente protocolo:

1- Bajo condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar, se toman 10 gramos de suelo/sedimento y se disuelven en 90 mL de agua estéril en frasco Schott de 300 mL de capacidad previamente esterilizados, como primera dilución  $10^1$ . Luego se toma 1 mL de la dilución inicial y se disuelven en 9 mL de agua estéril y así sucesivamente hasta llegar a

la dilución  $10^3$ , en tubos cónicos estériles de 50 mL de capacidad, manteniendo los volúmenes equivalentes para las diluciones.

2- Se toma 1 mL de cada una de las 3 diluciones y se siembran por superficie en placas de Petri con 10 mL del medio de cultivo Agar BM (Tabla 4). Estas serán esparcidas sobre la placa con ayuda de asa estéril por técnica de extensión.

3- Las placas deben ser selladas entre la tapa y la placa con parafilm para evitar la rápida deshidratación del medio y ser mantenidas en condiciones aerobias de incubación a  $26^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ , entre 5 y 10 días.

4- Pasado el tiempo de incubación, de cada una de las placas, se toman las colonias que presenten particularidades interesantes de crecimiento y se repican nuevamente en placas por técnica de agotamiento para tener la veracidad de una única colonia.

5- Al tener la certeza de que cada aislamiento sea una única colonia, esta se replica con ayuda de asa estéril en tubos cónicos de 50 mL con 20 mL de medio Caldo BM a  $26^\circ \pm 2^\circ \text{C}$  en agitación a 200 rpm por 10 días hasta notar una recuperación importante del aislamiento.

6- Al obtener una cantidad de biomasa suficiente, se toman 0,5 mL del medio con células y se depositan en crio-viales con igual volumen de glicerol al 50% como agente crio-preservante, y conservar por ultracongelación a  $-80^\circ \text{C}$ .

#### **4.2.2. Protocolo para extracción de bacterias de artrópodos.**

Los artrópodos fueron capturados en recipientes estériles para muestras biológicas y mantenidos vivos hasta ser transportados al laboratorio. Previo al procesamiento para la extracción de bacterias, los artrópodos fueron sometidos a ultracongelación a  $-80^\circ \text{C}$  durante 30 minutos para poder ser manipulados. La extracción se realizó estableciendo el siguiente protocolo:

1- De manera individual y en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar, cada artrópodo debe ser lavado con ayuda de hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 30

segundos sumergiendo el cuerpo completo del artrópodo, y enjuagar con agua destilada estéril. Este procedimiento se repite, y se enjuaga con suficiente agua para eliminar el exceso de hipoclorito.

2- Lavar cada artrópodo con alcohol etílico al 75%, y sumergir en su totalidad el cuerpo del artrópodo durante 30 segundos, luego ser enjuagó con agua destilada. Este procedimiento se repite y se deja secar la muestra dentro de la cabina.

3- Para verificar que el procedimiento de limpieza exterior de los artrópodos fue efectivo, se realiza un último enjuagado sobre la muestra con agua destilada estéril, que es recogida en placa de petri estéril, de la cual se toma 1mL que será sembrado por superficie en una placa con medio de cultivo nutritivo, con la cual se comprueba no haya crecimiento de colonias y así determinar que la desinfección fue efectiva.

4- Se macera el artrópodo con mortero estéril y se le agrega 1mL de agua estéril debido a la viscosidad de la muestra, separando las partículas sólidas y obteniendo el contenido líquido como dilución inicial que se deposita en tubo eppendorf de 2,0 mL. Este líquido se almacena a 4°C.

5- Se toma 0,1 mL de la dilución inicial y se disuelve en 0,9 mL de agua estéril y así sucesivamente hasta llegar a la dilución  $10^3$ , en tubos eppendorf estériles de 2,0 mL de capacidad.

6- Se toma 1 mL de cada una de las 3 diluciones y se siembran por superficie en placas de Petri con 10mL del medio de cultivo Agar BM (Tabla 4). Estas serán esparcidas sobre la placa con ayuda de asa estéril por técnica de extensión.

7- Las placas deben ser selladas entre la tapa y la placa con parafilm para evitar la rápida deshidratación del medio y ser mantenidas en condiciones aerobias de incubación a  $26^{\circ} \pm 2$  C, entre 5 y 10 días.

8- Pasado el tiempo de incubación, de cada una de las placas, se toman las colonias que presenten particularidades interesantes de crecimiento y se repican nuevamente en placas por técnica de agotamiento para tener la veracidad de una única colonia.

9- Al tener la certeza de que cada aislamiento sea una única colonia, esta se repica con ayuda de aza estéril en tubos cónicos de 50 mL con 20mL de medio Caldo BM a  $26^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  en agitación a 200 rpm por 10 días hasta notar una recuperación importante del aislamiento.

10- Al obtener una cantidad de biomasa suficiente, se toman 0,5 mL del medio con células y se depositan en crio-viales con igual volumen de glicerol al 50% como agente crio-conservante, y mantener por ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.3. Protocolo para extracción de bacterias endófitas de raíz.**

Para la obtención de las bacterias endófitas de raíz, se removió el exceso de tierra y otros elementos que pudieran interferir en la extracción, con abundante agua de grifo. Las muestras de bacterias endófitas fueron adquiridas mediante el siguiente procedimiento:

1- Dentro de cabina laminar, se procede a lavar las raíces, sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 70% durante 30 segundos y se enjuaga con agua estéril. Este procedimiento se repite 2 veces.

2- Se lava la raíz utilizando alcohol etílico al 70%, sumergiéndolas durante 30 segundos, este procedimiento se repite 2 veces. Luego la raíz se deja secar.

3- Para verificar que el procedimiento de limpieza exterior de las raíces fue efectivo, se realiza un último enjuagado sobre la muestra con agua destilada estéril, que es recogida en placa de petri estéril, de la cual se toma 1mL que será sembrado por superficie en una placa con medio de cultivo nutritivo, con la cual se comprueba no haya crecimiento de colonias y así determinar que la desinfección fue efectiva.

4- Se realizan cortes con tijeras o cuchilla estériles de las partes blandas de la raíz y se maceran agregando 1 mL de agua estéril como dilución inicial. Se separan los elementos sólidos del macerado y se retira el contenido líquido, depositándolo en tubos eppendorf estériles. Esta muestra se almacena en tubos eppendorf de 2,0 mL a  $4^{\circ} \text{C}$ .

5- Se toma 0,1 mL de la dilución inicial y se disuelve en 0,9 mL de agua estéril y así

sucesivamente hasta llegar a la dilución  $10^3$ , en tubos eppendorf estériles de 2,0 mL de capacidad.

6- Se toma 1 mL de cada una de las 3 diluciones y se siembran por superficie en placas de Petri con 10 mL del medio de cultivo Agar BM (Tabla 4). Estas serán esparcidas sobre la placa con ayuda de asa estéril por técnica de extensión.

7- Las placas deben ser selladas entre la tapa y la placa con parafilm para evitar la rápida deshidratación del medio y ser mantenidas en condiciones aerobias de incubación a  $26^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ , entre 5 y 10 días.

8- Pasado el tiempo de incubación, de cada una de las placas, se toman las colonias que presenten particularidades interesantes de crecimiento y se repican nuevamente en placas por técnica de agotamiento para tener la veracidad de una única colonia.

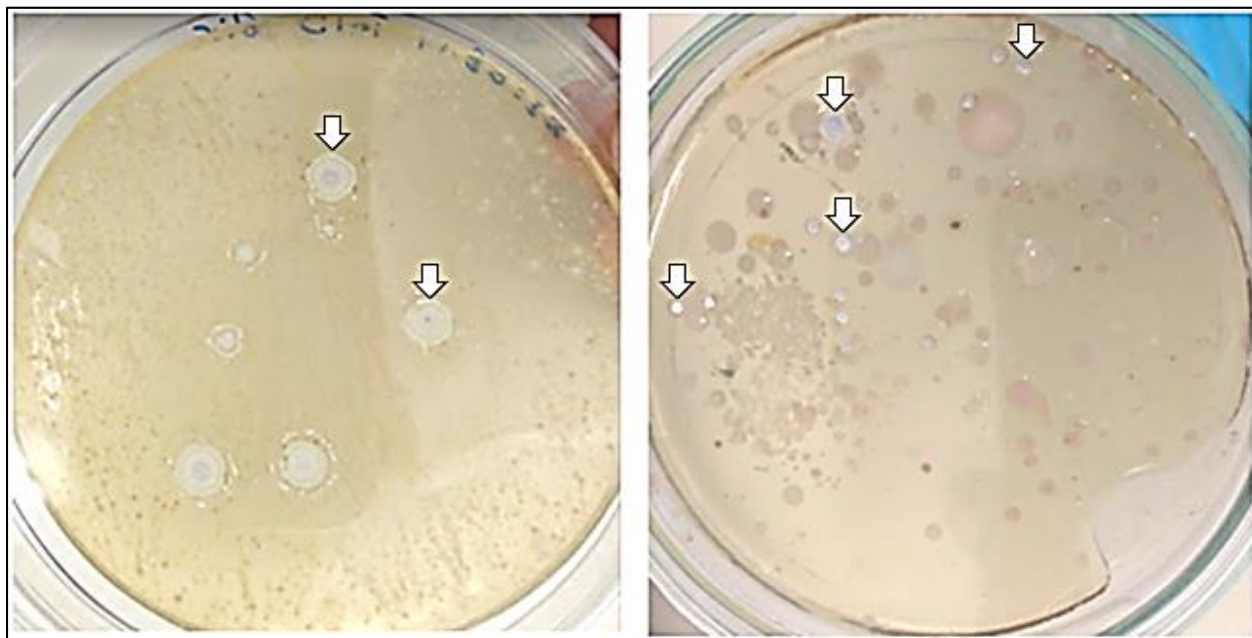
9- Al tener la certeza de que cada aislamiento sea una única colonia, esta se replica con ayuda de asa estéril en tubos cónicos de 50 mL con 20 mL de medio Caldo BM a  $26^\circ \pm 2^\circ \text{C}$  en agitación a 200 rpm por 10 días hasta notar una recuperación importante del aislamiento.

10- Al obtener una cantidad de biomasa suficiente, se toman 0,5 mL del medio con células y se depositan en crio-viales con igual volumen de glicerol al 50% como agente crio-conservante, y mantener por ultracongelación a  $-80^\circ \text{C}$ .

#### **4.3. Selección de bacterias para bioprospección por descripción fenotípica en placa.**

Por ser un medio de cultivo desarrollado para bacterias gram positivas, se asume crecimiento únicamente de bacterias con tal característica, corroborados por tinción de gram al azar de colonias en placa de las primeras muestras a procesar (resultados no mostrados), las cuales fueron todas gram positivas. La principal característica por la cual se seleccionaron las colonias, fue el parecido morfológico a colonias en placa de actinobacterias, ya que se conocen como potenciales productores de metabolitos de

interés en salud<sup>119</sup>. Esta selección tiene como énfasis particularidades específicas de crecimiento visibles en placa como lo son, colonias puntiformes sólidas secas, circulares, filamentosas, con micelio dentro del sustrato (medio solido), micelio aéreo (hifas), formación de esporas y la generación de pigmentos, que también fue un factor a tener en cuenta ya que se asocia a la determinación de nuevas especies<sup>120</sup> (Figura 1).

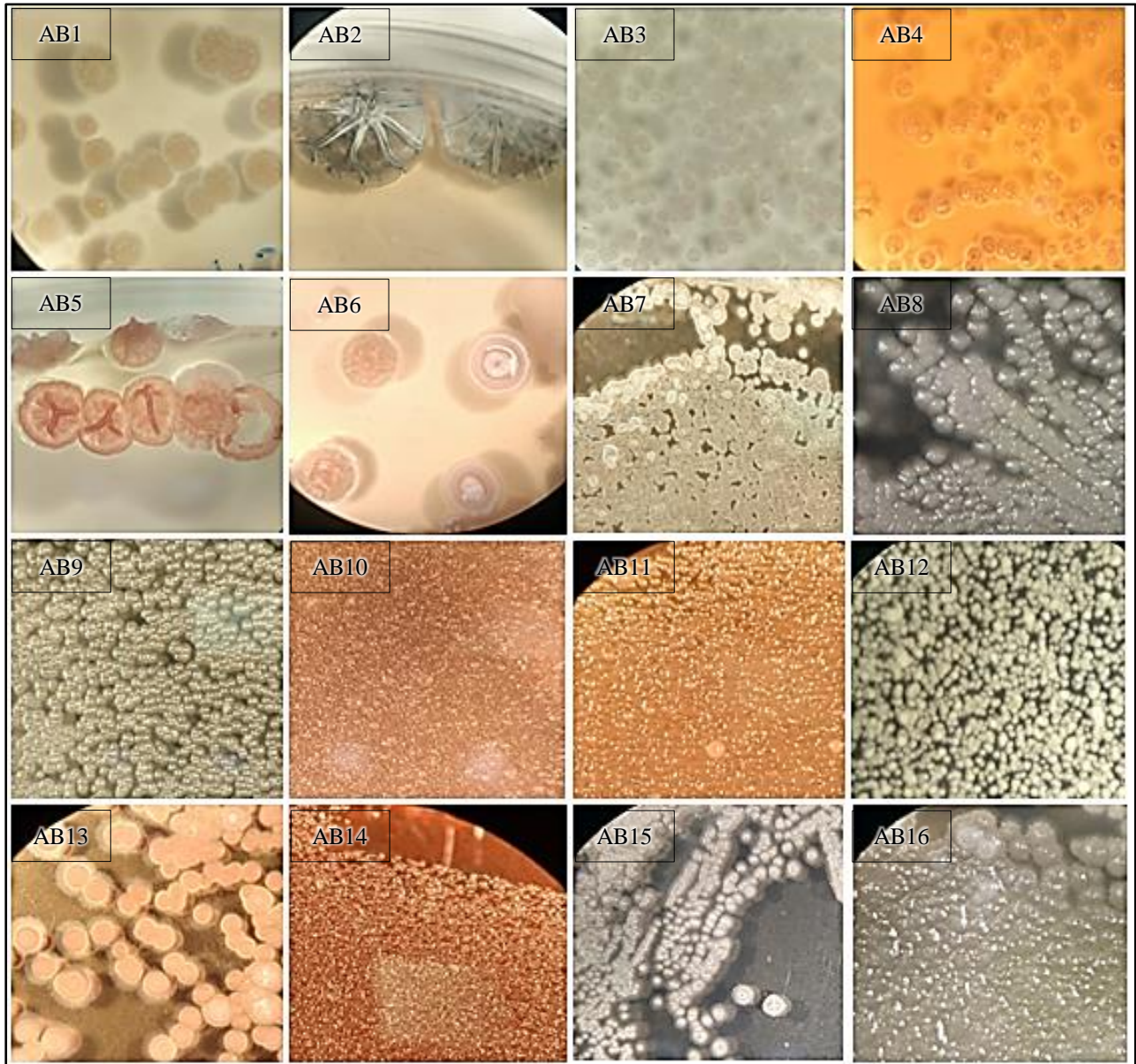


**Figura 1.** Colonias de bacterias aisladas de suelo de Bosque Seco Tropical. Las flechas indican las colonias con las características a tener en cuenta para ser seleccionadas, cuya morfología es similar a las actinobacterias.

#### **4.4. Almacenamiento y creación de biorepositorio de bacterias del departamento del Atlántico. (Tabla con aislamientos, código, origen, etc)**

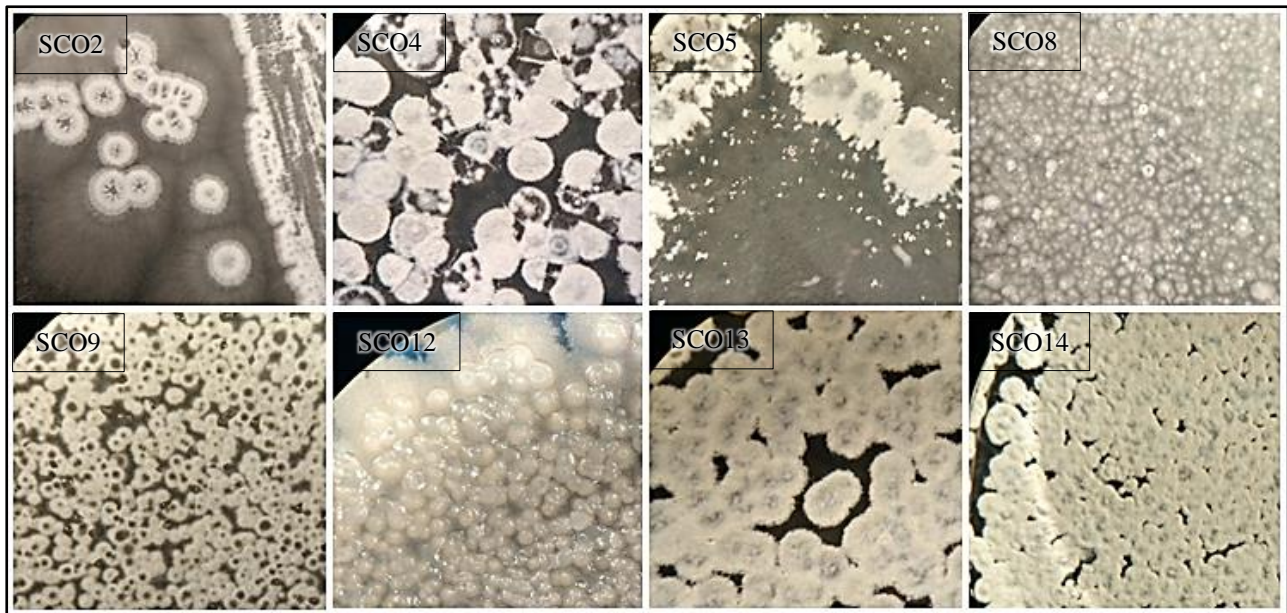
La obtención de los aislamientos presumiblemente diferentes se realizó teniendo en cuenta las colonias de las tres diluciones de cada muestra sembrada en placa, y la selección y purificación de los aislamientos se llevó a cabo como se describe en los “Protocolos para extracción de bacterias” (Pag 33-36). A partir de la obtención pura de los aislamientos se elabora un biorepositorio de bacterias del departamento del Atlántico, obtenidas de diferentes ecosistemas. Este tiene como finalidad mantener un registro de

bacterias de esta zona del país, para respaldar futuras investigaciones científica.

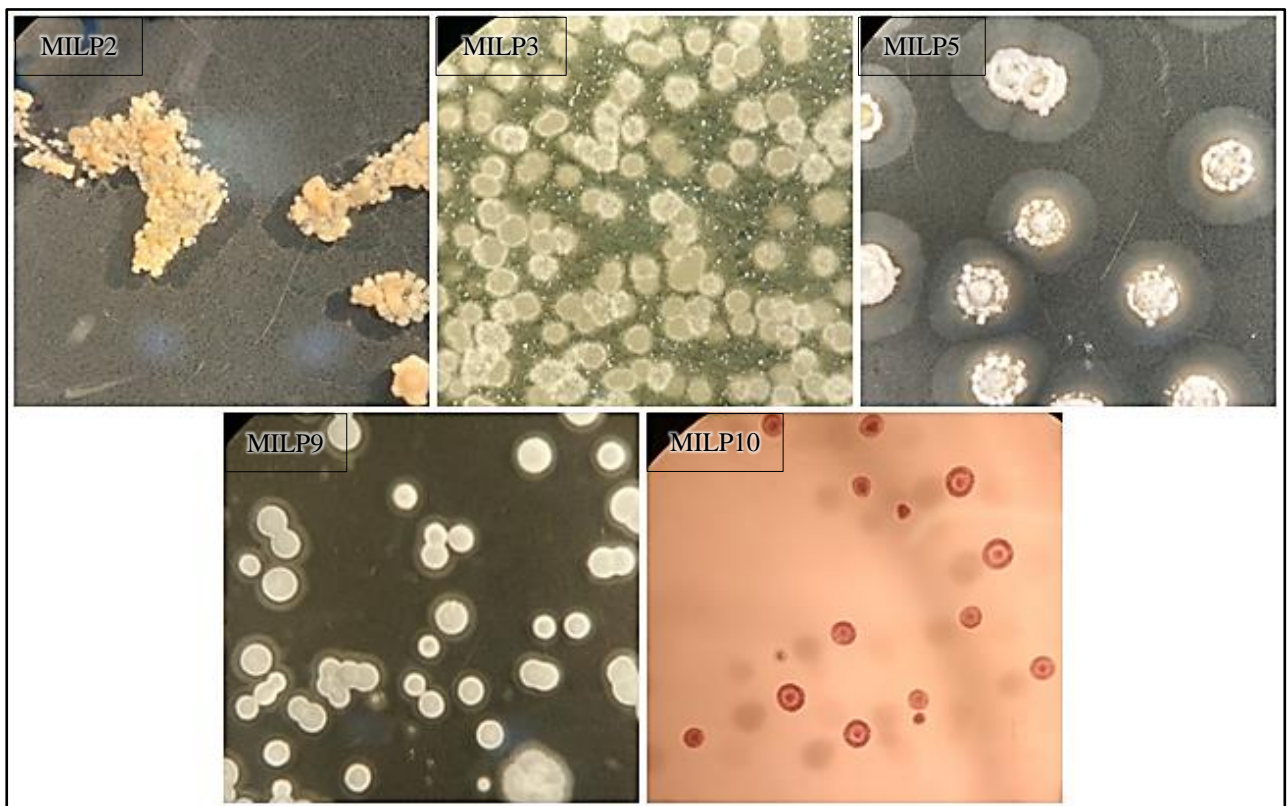


**Figura 2.** Aislamientos puros de bacterias extraídas de Bosque Seco Tropical en placas de medio de cultivo nutritivo, con su correspondiente código y particularidades morfológicas distintivas.



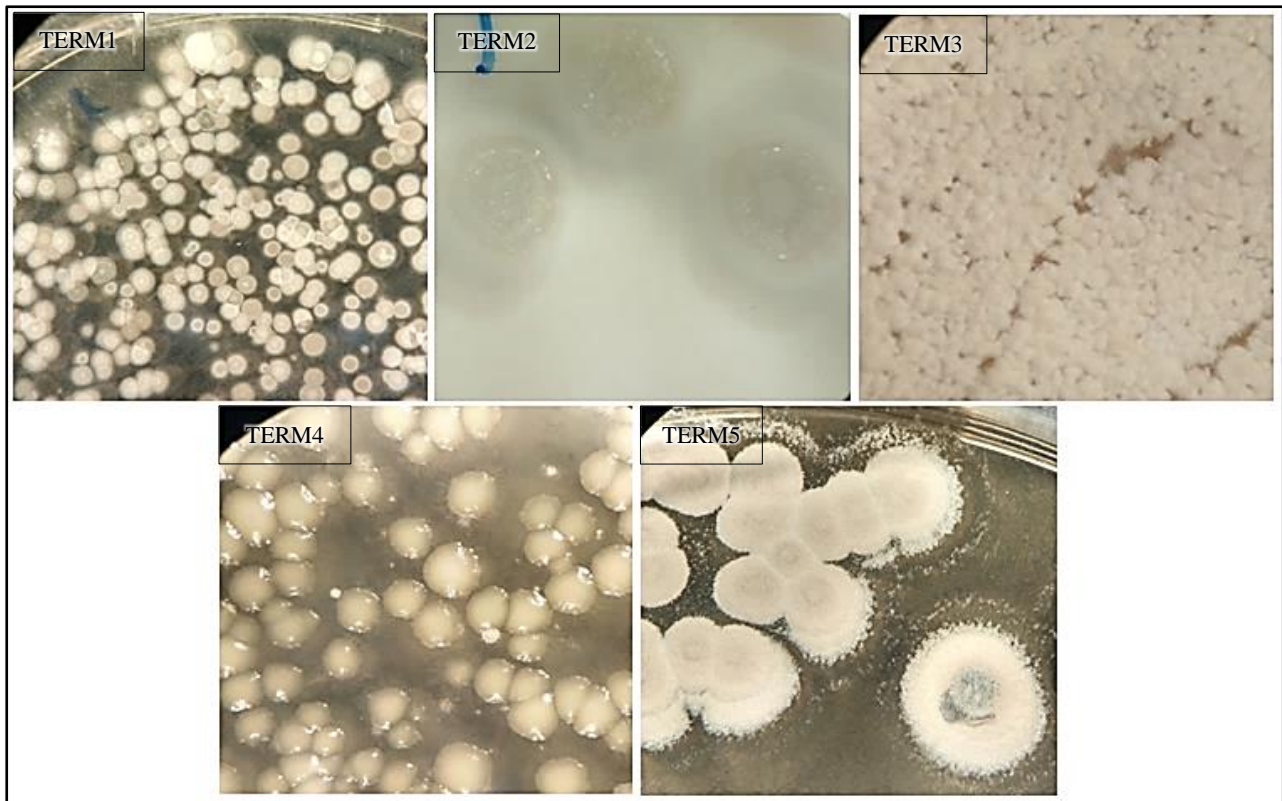


**Figura 3.** Aislamientos puros de bacterias simbiotas de Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidades morfológicas distintivas.

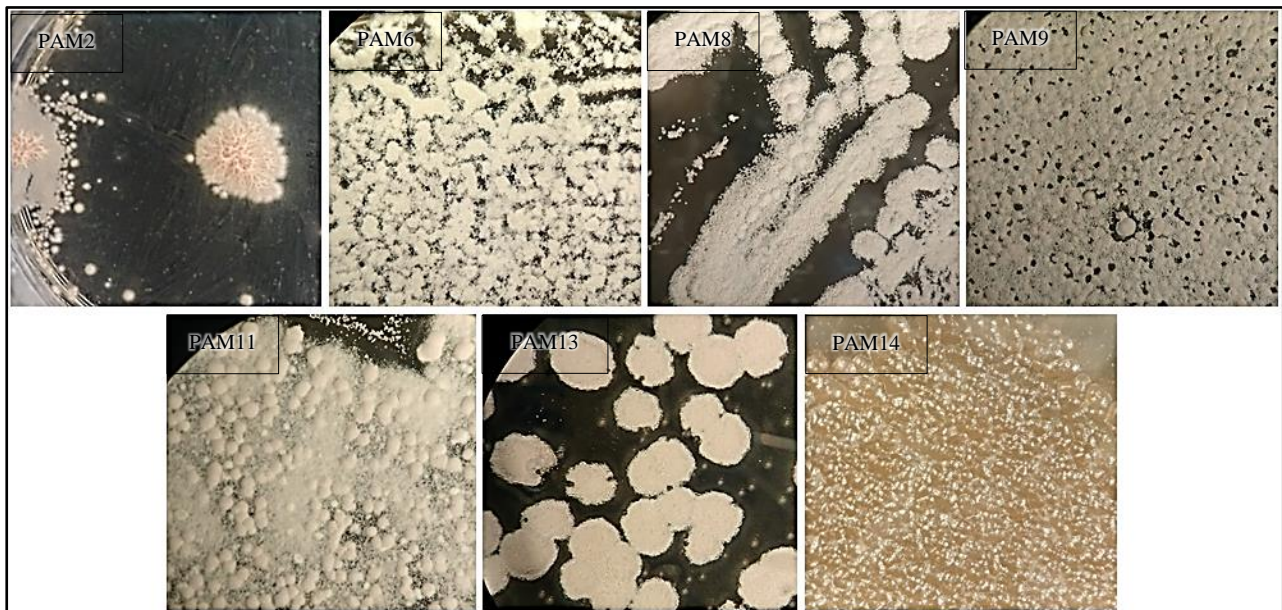


**Figura 4.** Aislamientos puros de bacterias simbiotas de Arthropoda: Diplopoda – Milpiés en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidades morfológicas distintivas.

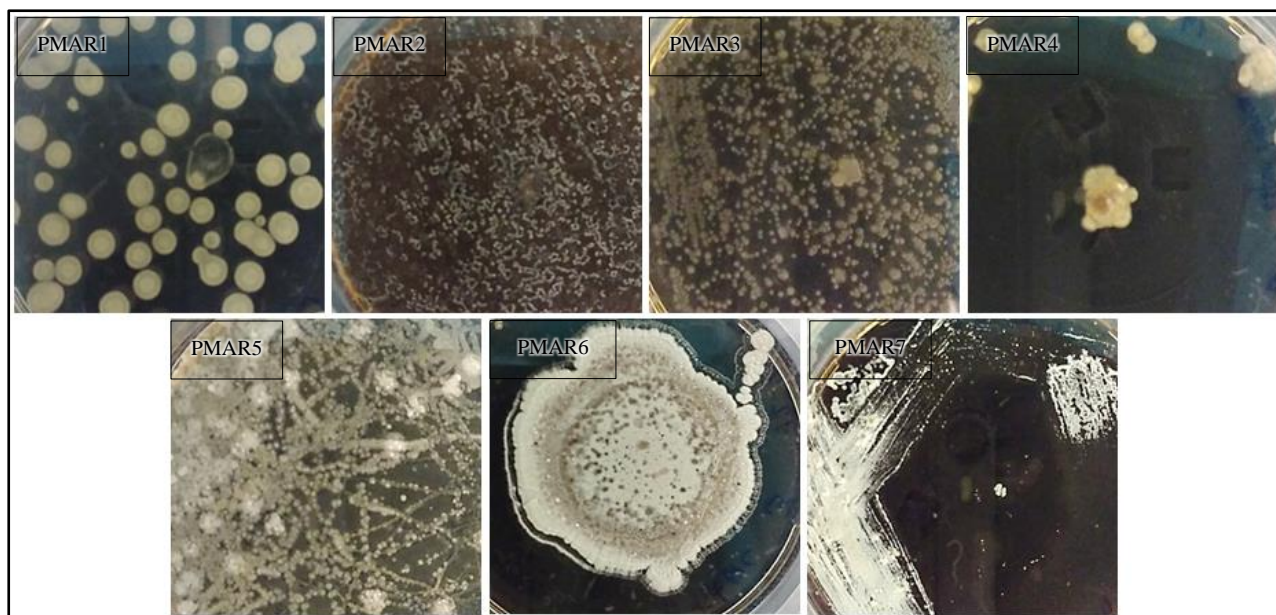




**Figura 5.** Aislamientos puros de bacterias simbiotes de Isóptera (Termitas) en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidades morfológicas distintivas.



**Figura 6.** Aislamientos puros de bacterias simbiotes de *Periplaneta americana* (Linnaeus) “Cucaracha común” en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidades morfológicas distintivas.



**Figura 7.** Aislamientos puros de bacterias endófitas de raíz de la planta *Piper marginatum* (Jacq) en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidades morfológicas distintivas.



**Figura 8.** Aislamiento puro de bacteria de sedimento de la Ciénaga del Totumo en placas de medio de cultivo nutritivo, con su código correspondiente y particularidad morfológica distintiva.

Se obtuvo un total de 49 aislamientos que fueron repicados para obtener cultivos completamente puros y ser mantenidos por ultracongelación, dispuestos en el Laboratorio de Investigación de Química y Biología, en el departamento que lleva el mismo nombre de la Universidad del Norte.

#### **4.5. Actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de bacterias del departamento del Atlántico.**

La actividad antibacterial se llevó a cabo utilizando cepas bacterianas que no implican un riesgo alto de manipulación y cuya facilidad de manejo les permite ser utilizadas como modelos experimentales que no pongan en riesgo la salud del investigador por ser tratadas en un laboratorio de investigación de nivel de II.

Al tratarse de una vacuna, la cepa de *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) ha perdido su patogenicidad lo que disminuye el riesgo de manipulación. Pese a ello la similitud genética con la cepa virulenta *M. tuberculosis* es del 99,95%, lo que la hace un modelo adecuado para determinar ensayos *in vitro* de tuberculosis <sup>121</sup>.

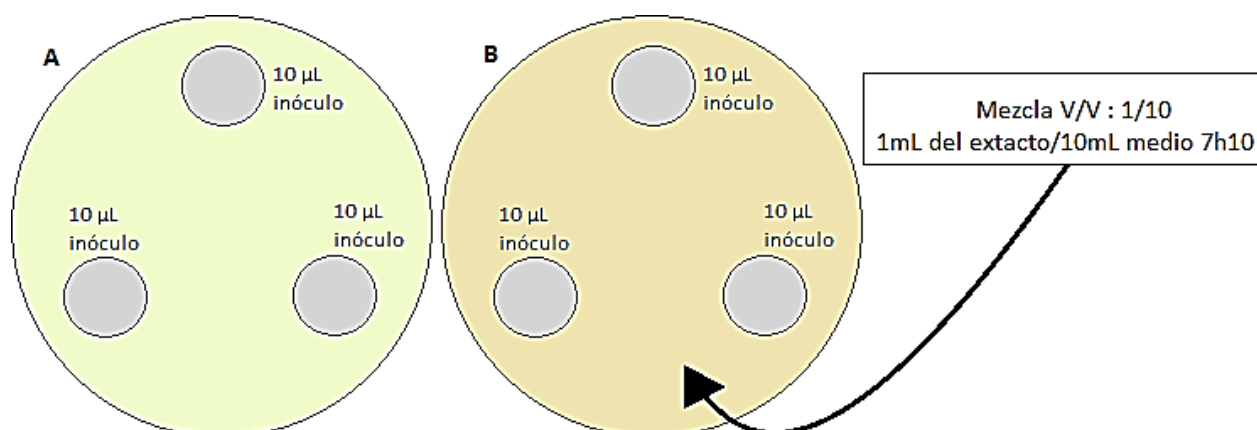
Caso similar es el de utilizar las cepas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). A pesar de que se trata de cepas que si no son manipuladas de manera adecuada, pueden generar alguna patología, son ampliamente utilizadas como modelos *in vitro* para ensayos biológicos contra bacterias por múltiples razones. Entre ellas la rapidez de crecimiento, bajo costo de mantenimiento, genética estable y por tratarse de especies ampliamente conocidas, entre otras <sup>122,123</sup>.

Este estudio utiliza estos modelos biológicos para establecer actividad antibacterial contra estas cepas.

##### **4.5.1. Evaluación de la actividad anti-micobacteriana de los extractos frente a la cepa *Mycobacterium bovis* BCG como método cualitativo de pre-validación contra cepas patógenas de *Mycobacterium tuberculosis*.**

Se evaluó la actividad anti-micobacteriana de los extractos frente a la cepa *Mycobacterium bovis* BCG, probando los extractos de los 49 aislamientos obtenidos, realizando un cribado con los mejores resultados, cuyo criterio de selección fue Inhibición Total (ausencia de colonias de *M. bovis* BCG) / Sin Inhibición (presencia de colonias de *M. bovis* BCG).





**Figura 9.** Dinámica del método de siembra en placa y determinación cualitativa de la actividad anti-micobacteriana frente a la cepa *M. bovis* BCG. Se muestran en gris los tres puntos donde se siembran por superficie 10 µL de la dilución  $10^3$  de la cepa a ensayar en fase log.

**Figura 9 A.** Medio de cultivo Middlebrook 7h10 suplementado y siembra por superficie de la cepa *M. bovis* BCG, como control positivo.

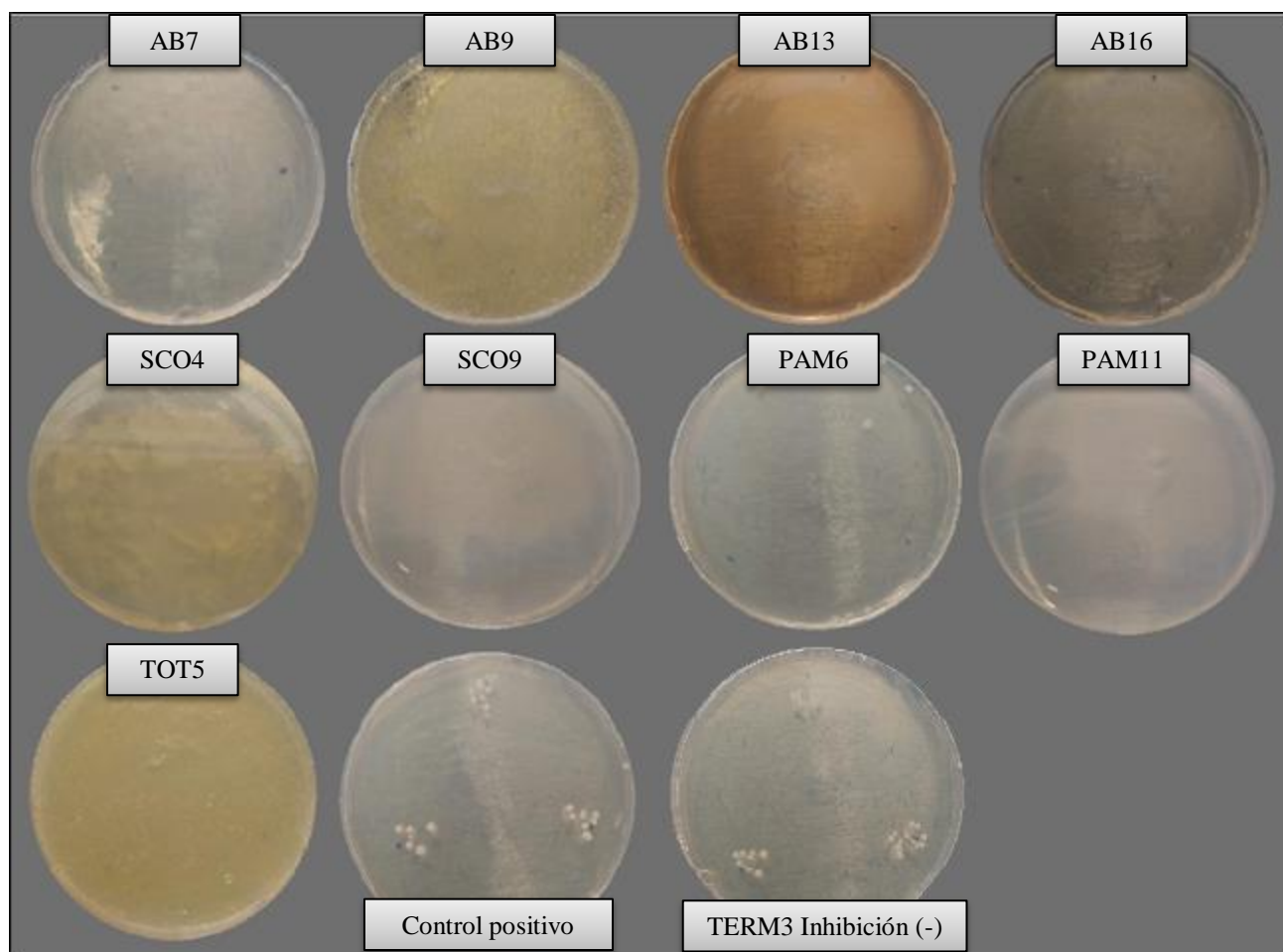
**Figura 9 B.** Mezcla de extractos acuosos bacterianos con medio de cultivo Middlebrook 7h10 suplementado y siembra por superficie de la cepa *M. bovis* BCG.

#### 4.5.1.1. Resultados promisorios

**Tabla 5.** Resultados de la inhibición generada por los extractos de origen bacteriano frente a cepa *M. bovis* BCG. Cribado y selección de los extractos resaltados de los mejores resultados.

Código del extracto	Origen del aislamiento	Actividad anti-micobacteriana
AB1	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB2	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB3	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB4	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB5	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB6	Suelo de BsT	Sin inhibición
<b>AB7</b>	<b>Suelo de BsT</b>	<b>Inhibición Total</b>
AB8	Suelo de BsT	Sin inhibición
<b>AB9</b>	<b>Suelo de BsT</b>	<b>Inhibición Total</b>
AB10	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB12	Suelo de BsT	Sin inhibición
<b>AB13</b>	<b>Suelo de BsT</b>	<b>Inhibición Total</b>
AB14	Suelo de BsT	Sin inhibición
AB15	Suelo de BsT	Sin inhibición
<b>AB16</b>	<b>Suelo de BsT</b>	<b>Inhibición Total</b>
SCO1	Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés	Sin inhibición
SCO2	Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés	Sin inhibición
<b>SCO4</b>	<b>Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés</b>	<b>Inhibición Total</b>
SCO5	Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés	Sin inhibición

SCO8	Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés	Sin inhibición
<b>SCO9</b>	<b>Arthropoda: Chilopoda –Ciempiés</b>	<b>Inhibición Total</b>
SCO12	Arthropoda: Chilopoda –Ciempiés	Sin inhibición
SCO13	Arthropoda: Chilopoda –Ciempiés	Sin inhibición
SCO14	Arthropoda: Chilopoda – Ciempiés	Sin inhibición
MILP2	Arthropoda: Diplopoda – Milpiés	Sin inhibición
MILP3	Arthropoda: Diplopoda – Milpiés	Sin inhibición
MILP5	Arthropoda: Diplopoda – Milpiés	Sin inhibición
MILP9	Arthropoda: Diplopoda – Milpiés	Sin inhibición
MILP10	Arthropoda: Diplopoda – Milpiés	Sin inhibición
TERM1	Isoptera (Termita)	Sin inhibición
TERM2	Isoptera (Termita)	Sin inhibición
TERM3	Isoptera (Termita)	Sin inhibición
TERM4	Isoptera (Termita)	Sin inhibición
TERM5	Isoptera (Termita)	Sin inhibición
PAM2	<i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)	Sin inhibición
<b>PAM6</b>	<b><i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)</b>	<b>Inhibición Total</b>
PAM8	<i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)	Sin inhibición
PAM9	<i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)	Sin inhibición
<b>PAM11</b>	<b><i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)</b>	<b>Inhibición Total</b>
PAM13	<i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)	Sin inhibición
PAM14	<i>Periplaneta americana</i> (Cucaracha)	Sin inhibición
PMAR1	Piperaceae <i>Piper marginatum</i>	Sin inhibición
PMAR2	Piperaceae <i>Piper marginatum</i>	Sin inhibición
PMAR3	Piperaceae <i>Piper marginatum</i>	Sin inhibición
PMAR4	Piperaceae <i>Piper marginatum</i>	Sin inhibición
PMAR5	Piperaceae <i>Piper tuberculatum</i>	Sin inhibición
PMAR6	Piperaceae <i>Piper tuberculatum</i>	Sin inhibición
PMAR7	Piperaceae <i>Piper tuberculatum</i>	Sin inhibición
<b>TOT5</b>	<b>Sedimento Ciénaga del totumo</b>	<b>Inhibición Total</b>



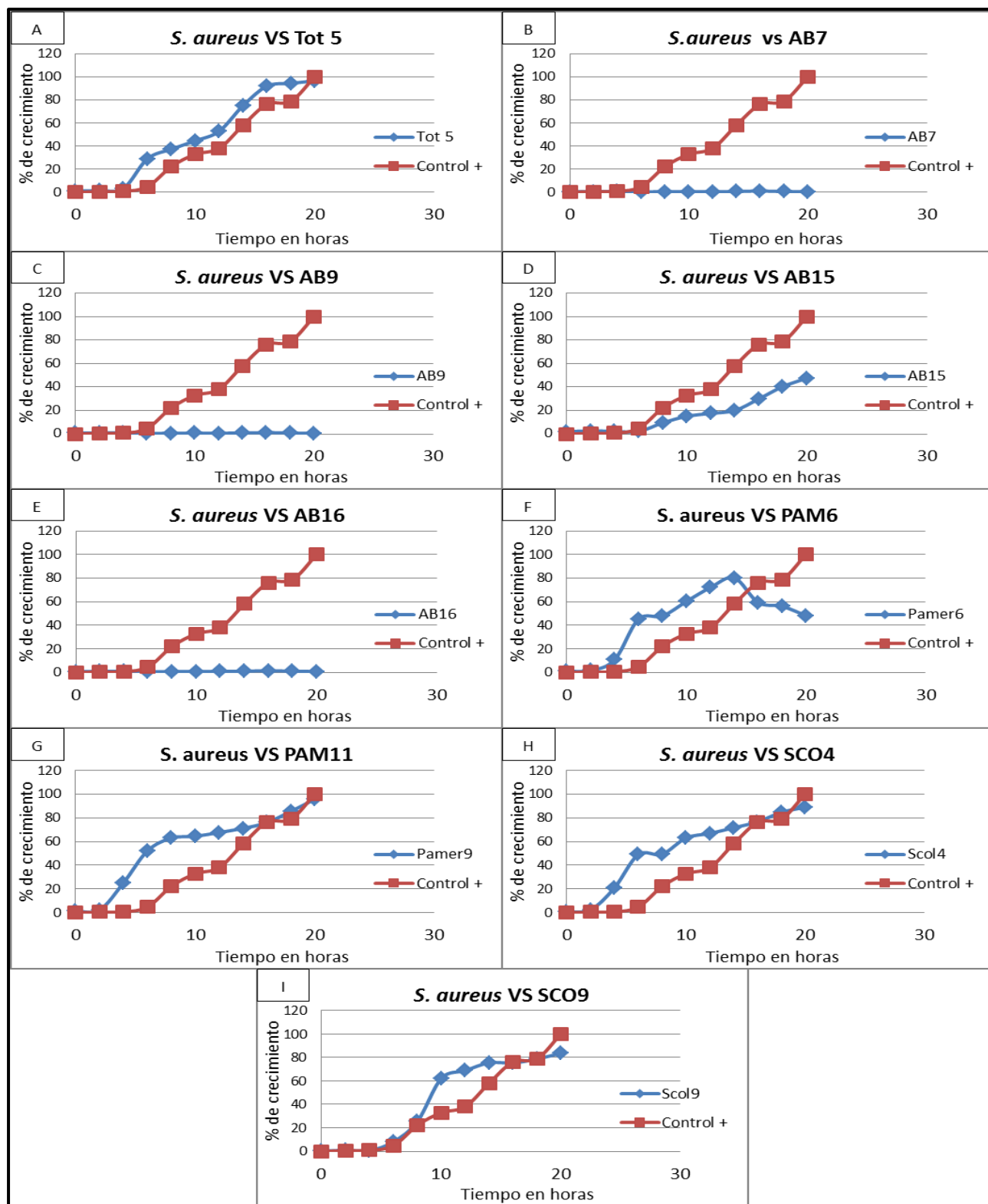
**Figura 10.** Resultados de la inhibición total causada por la composición 1/10 de los extractos bacterianos AB7, AB9, AB13, AB16, SCO4, SCO9 PAM6, PAM11 y TOT5, con el medio de cultivo Middlebrook 7h10, sobre la cepa *M. bovis* BCG, basados en el método de siembra en placa y determinación cualitativa de la actividad anti-micobacterial (Figura 9). El control positivo corrobora el crecimiento normal de la micobacteria en placa mientras TERM3 es ejemplo de la inhibición negativa que presentaron el resto de extractos.

#### 4.5.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos frente a las cepas *E. coli* y *S. aureus*. (Gráficas de las actividades antibacterial).

Los extractos de los 9 aislamientos que mostraron actividad anti-micobacterial contra *M. bovis* BCG (Tabla 5) fueron probados contra las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

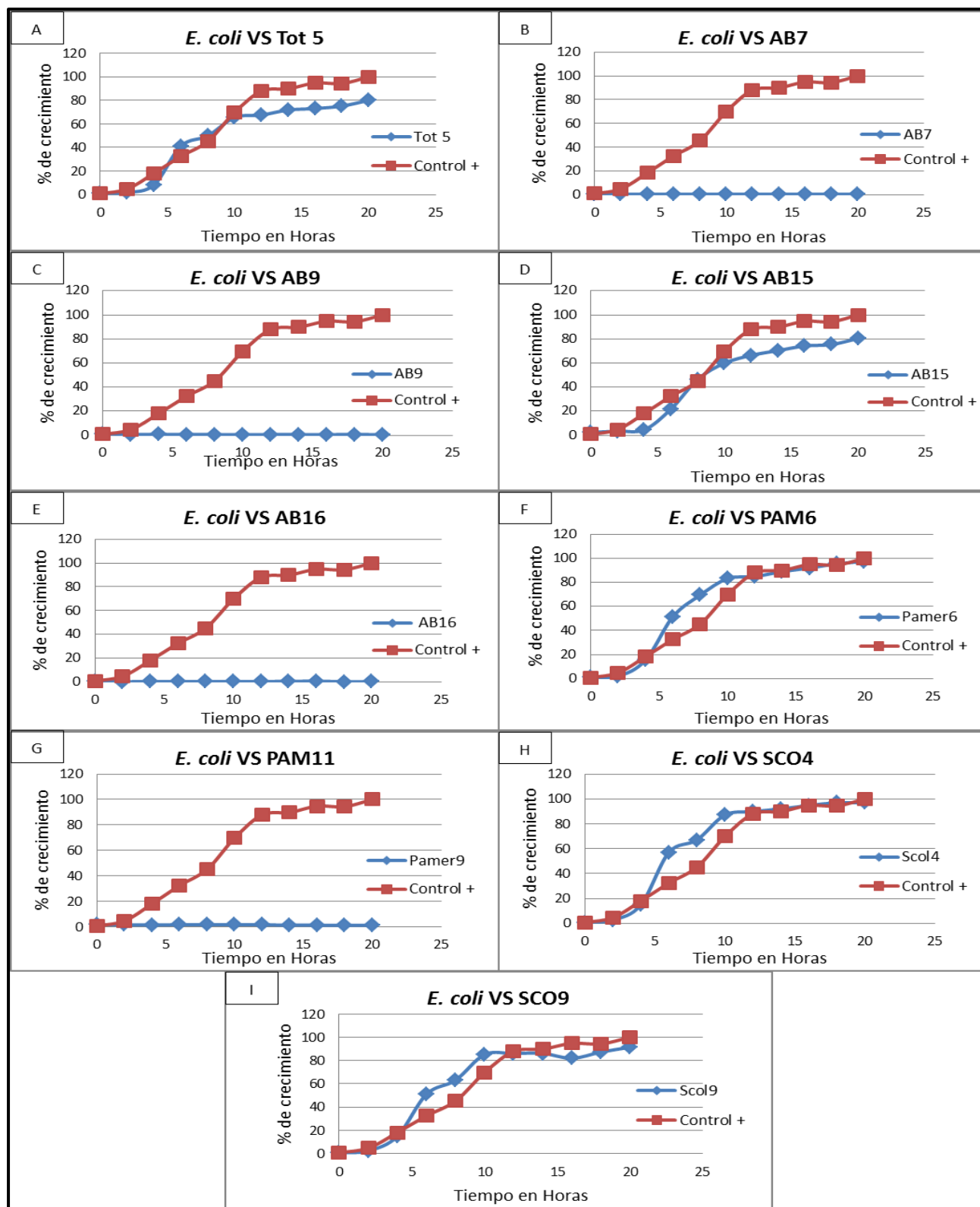
La actividad antimicrobiana de los extractos de origen bacteriano se muestra en las Figuras 11 y 12. Los resultados de la actividad de los extractos indican la presencia de

metabolitos antimicrobianos que no permitieron el crecimiento de las cepas modelos. Específicamente los extractos AB7, AB9 y AB16 muestran inhibición del 100% para *S. aureus* (Figura 11). De igual manera los extractos AB7, AB9, AB16 y adicional PAM11, muestran inhibición del 100% para *E. coli*, mientras AB15 muestra inhibición del 50% (Figura 12).



**Figura 11.** Actividad antibacteriana de los extractos bacterianos evaluados con ensayo de lectura en microplacas de 96 pozos, contra la cepa bacteriana *S. aureus*, en proporciones de 1/10; Volumen/Volumen. Los extractos AB7, AB9, AB16 (**Figura 11B, 11C, 11E**) demuestran actividad antibacteriana del 100% contra *S. aureus*, mientras AB15 muestra inhibición del 50% (**Figura 12D**).





**Figura 12.** Actividad antibacteriana de los extractos bacterianos evaluados con ensayo de lectura en microplacas de 96 pozos, contra la cepa bacteriana *E. coli*, en proporciones de 1/10; Volumen/Volumen. Al igual que con *S. aureus*, los extractos AB7, AB9 y AB16 (Figura 12B, 12C, 12E) muestran actividad antibacteriana del 100% contra *E. coli*. El extracto y PAM11 (Figura 12G) también genera una inhibición del 100%.

#### **4.5.2.1. Resultados promisorios.**

Teniendo en cuenta que se trata de un ensayo rápido para determinar la actividad antibacterial de metabolitos provenientes de otras bacterias y que para ello se establece utilizar la solución no concentrada en proporciones de 1/10 : Volumen del medio de cultivo acuoso en el que han crecido dichas bacterias / Volumen de medio de cultivo para crecimiento de las cepas a probar, se puede decir que los extractos AB7, AB9 y AB16 demuestran una inhibición del 100% para *S. aureus* (Figura 11B, 11C, 11E), mientras AB15 muestra una inhibición 50% (Figura 11D).

La actividad antibacteriana contra *E. coli*, al igual que contra *S. aureus*, muestra que los extractos AB7, AB9, AB16, inhiben el 100% de crecimiento (Figura 12B, 12C, 12E). Esta misma inhibición se obtiene con el extracto PAM11 (Figura 12G).

Se resalta el hecho de que las concentraciones de los metabolitos deben estar relativamente bajas por las proporciones de volúmenes utilizadas, pero que este método genera de manera rápida resultados lo suficientemente veraces para asumir la presencia de metabolitos con actividad biológica sin haber acudido a una extracción química.

#### **4.6. Taxonomía molecular de 3 bacterias que presentaron actividad antibacteriana.**

Para la identificación molecular, se eligieron los aislamientos PAM6, PAM11 y TOT5 bajo la premisa de haber presentado buena actividad biológica y provenir de orígenes en los que convencionalmente se dificulta o es poco común tomar muestras para la obtención de bacterias. Misma razón para tratar de encontrar alguna bacteria aun no reportada en las bases de datos de especies disponibles en la web.

Luego de la obtención de ADN de los 9 aislamientos que presentaron mejor actividad antimicobacteriana, y la elección de los aislamientos a identificar PAM6, PAM11 y TOT5, las secuencias de 16s se amplificaron utilizando los primers 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'.

La amplificación se llevó a cabo por parte del Instituto de Microbiología de la Praga, en la República Checa (Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Praha - Czech Republic).

- Para la muestra PAM6 las secuencias obtenidas y analizadas fueron:

**>95DI84\_11\_27f**

```
CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCG
GGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCG
GCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCACCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGA
```

**>95DI87\_11\_1492r**

```
CTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTC
GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG
ATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAA
CTGAGAACGGTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGT
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGC
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTC
TAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTA
```

- Para la muestra PAM11 las secuencias obtenidas y analizadas fueron:

**>95DI82\_13\_27f**

CACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAG  
TAACACGTGAGCAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCGGTGGAAACGCCGTCTAAT  
ACCGGATACGACCTTCCGCCTCATGGTGGAGGGTGGAAAGTTTTTTCGGTCAGGGAT  
GGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGATTACGG  
GTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCGA  
CGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTACCACCAACGCAGG  
CTCCGGGTTCTCTCGGGGTTGACGGTAGGTGGGGAATAAGGACCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA  
AGAGCTCGTAGGCGGCGTGTCCCGTCTGCTGTGAAAGACCGGGGCTTAACTCCGGTT  
CTGCAGTGGATACGGGCATGCTAGAGGTAGG

**>95DI85\_13\_1492r**

TCACTCCCTCCCCGAAGGGTTAGGCCGCAAGTTTCGGGTGTTGCCGACTTTCATGAC  
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTTGCTGATCC  
GCGATTACTAGCGACTCCACCTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC TG  
AGACCGGCTTTAAGGGATTCGCTCCACCTTACGGTATCGCACGCCCATTTGTACCGGC  
CATTGTAGCATGTTTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCC  
CACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCACCATTACGTGCTG  
GCAACATGGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC  
GAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTCACCCACCAACTAAATGACCCTGTATCTCT  
ACAGGTCCACGGGTGATGTCAAACCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAG  
CAACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC  
GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAACCGTGG  
AAAGTCCCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATC  
CTGTTGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGGTAAGGCCAGAGACCCGCCT  
TCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAAATT

- Para la muestra TOT5 las secuencias obtenidas y analizadas fueron:

**>95DI81\_18\_27f**

TACCATGCAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG  
 AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTA  
 ATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGG  
 ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGAC  
 GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG  
 CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAG  
 AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
 GCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA  
 GGCGGCTTGTACGTTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCG  
 ATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA  
 TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG  
 ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC  
 GCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT  
 AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGCTAAACTCAAGGAATTG  
 ACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTAATTCGACGCACGCGAAAACC

**>95DI86\_18\_1492r**

CTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTT  
 TCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATG  
 CTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATC  
 CGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATTGTA  
 CCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTC  
 GTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCCGTGAGTCCCCAGCACCACA  
 AGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC  
 ATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGG

GCGCCTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG  
 CGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG  
 TTTTAGCCTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCAC  
 GGACAACGTGGAATGTTGCCCACACCTAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCA  
 GGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCA  
 GAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACC  
 AGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCCGG  
 GGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGC  
 CCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG  
 TTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGG  
 TTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGGGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCC  
 ATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAG

**Tabla 6.** Identificación de aislamientos bacterianos por homología de ADNr 16S.

Aislamiento	GenBank	Mejor Hit	Homología
PAM6	MN093796.1	<i>Bacillus cereus</i>	100.00%
PAM11	NC_018524.1	<i>Nocardiopsis alba</i>	100.00%
TOT5	NR_112362.1	<i>Streptomyces sampsonii</i>	99.91%

De la amplificación de un fragmento de ADNr 16S, por parte de los iniciadores universales (Primers) de cada uno de los aislamientos seleccionados, las secuencias consenso fueron depositadas en las bases de datos de GenBank, y mediante el análisis BLAST, se encontró alta homología con secuencias reportadas para *Bacillus cereus*, *Nocardiopsis alba* y *Sterptomyces (sampsonii)* (Tabla 6).

## 5. Conclusiones y futuros estudios

Se concluye que, es posible la obtención de aislamientos bacterianos a partir de la preparación y optimización medios de cultivos alternativos, en busca de disminuir los

costos en investigación.

Además de ello, al ser Colombia uno de los países más biodiversos del planeta, los microorganismos no dejan de ser una fuente importante en cuanto al aporte de riquezas biológicas, a la cual se deben direccionar investigaciones puesto que es escasa la información, registros y reportes de nuevas especies de bacterias específicamente, sobre todo en el territorio norte colombiano.

Se han encontrado reportes de actividad antibacterial de amplio espectro de cepas silvestres del género *Bacillus*, contra cepas patógenas implicadas en infecciones de difícil tratamiento por la resistencia a los antibióticos <sup>124</sup>. Esto apoya la idea de buscar cepas en entornos locales que produzcan metabolitos de interés en encontrar nuevas moléculas de interés bioactivo.

Históricamente, se sabe que las actinobacterias o actinomicetos, como las bacterias de género *Nocardiosis* y *Streptomyces*, están relacionadas con un gran número conocido de compuestos altamente activos, especialmente este último género mencionado<sup>50</sup>. Se resalta que el primer antibiótico utilizado para el tratamiento de la tuberculosis fue la Streptomicina, extraída de la actinobacteria *Streptomyces griseus* en 1946<sup>125</sup>. Al ser un filo y clase de bacterias altamente distribuido en el mundo, se asume que los ecosistemas del caribe colombiano, del cual poco se ha estudiado respecto a actinobacterias con potencial en la industria, alberguen cepas con potencial antibacteriano de mucho interés.

Esta investigación brinda razones para determinar que las bacterias presentes en algunos ecosistemas del departamento del Atlántico colombiano, pueden ser una fuente importante en bioprospección, sobre todo una fuente de compuestos antimicrobianos tanto para combatir cepas tuberculosas como para otros patógenos.

Del mismo modo, se resalta el desarrollo de un método rápido y sobre todo de bajo costo, para determinar la bioactividad de metabolitos bacterianos, ya que evita el gasto en primera medida de solventes orgánicos para realizar la extracción de compuestos. Este método demuestra una premisa de qué tan activo pueden ser los metabolitos.

Futuros estudios: Reporte de especies de bacterias del departamento.

Para futuros estudios, aun es importante realizar el análisis para identificación molecular de 6 de los aislamientos que demostraron actividad importante contra *M. bovis* BCG, *E. coli* y *S. aureus*.

Además, es importante resaltar que los 49 aislamientos obtenidos, cuya morfología es evidenciada en esta investigación, son una base referente de especies que pueden ser estudiadas más a fondo, puesto que se convierten en pilar de nuevos registros o quizás nuevas especies reportadas en el departamento del Atlántico colombiano

Los extractos acuosos obtenidos de los aislamientos que demostraron mejor actividad antibacteriana, son preámbulo de metabolitos bioactivos importantes que deben ser extraídos y examinados para conocer su naturaleza química. Después de ello determinar las Concentraciones Mínimas de Inhibición (CMI) y la citotoxicidad.

Esta investigación demuestra el potencial biotecnológico de las bacterias que hacen parte también de la biodiversidad de nuestro país, como fuente de productos farmacéuticos, buscando contrarrestar la cada vez más complicada resistencia a los antibióticos.

## **6. Agradecimientos**

Primero, por encima de todo, a Dios y mi familia. A ti madre, a tu crianza. Incansable e incondicional ¡Para mí lo eres todo! A un padre sabio, trabajó de sol a sol y al que nunca le escuché queja. A una hermana inmarcesible, sigue sonriendo siempre bonita. Y a un hermano que emana nobleza por los poros, tu mejor enseñanza.

A mis compañeros de posgrado que ya son familia. Gracias por cada momento, por cada risa, por cada compartir, por cada almuerzo, por cada voz de ánimo, por cada refresco ¡Los llevo siempre!



A mi combo del fútbol. La mejor metáfora de la vida... Edgar, Daniel, Max, Nelson, Jhes y demás.

“Todo el mundo tiene sus problemas y el futbol es el psicólogo más barato, y lo seguirá siendo toda la vida”... Diego Forlán 2011.

Profesores Oscar Vidal, Ma. Cristina Martínez, JD Guzmán. Quedándome con las mejores cualidades de cada uno de ustedes. “Solo aquellos que se arriesgan a ir demasiado lejos pueden encontrar lo lejos que pueden llegar”. T.S Elliot.

A cada uno de ustedes en el departamento que siempre estuvo pendiente de mí. Que siempre brindó su tiempo y espacio por mi proceso.

¡Gracias por todo, gracias a todos!

## 7. Bibliografía

- 1 SiB. *Sistema de Información de Biodiversidad de Colombia. Las cifras de Biodiversidad en Colombia*, <<https://www.sibcolombia.net/biodiversidad-en-cifras/>> (2017).
- 2 Colciencias. *Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo*, <[http://www.colciencias.gov.co/sala\\_de\\_prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo](http://www.colciencias.gov.co/sala_de_prensa/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo)> (2016).
- 3 Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas (RNC) <<http://www.humboldt.org.co/es/servicios/registro-unico-nacional-de-colecciones-biologicas-rnc>> (2014).
- 4 Montoya-Cadavid, E. Colección de Bacterias del Museo de Historia Natural Marina de Colombia – Makuriwa (Invemar). *Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR 2.0* (2018).
- 5 Módulo de Consultas - Componente Cepario de Bacterias Marinas CCBM, <[http://buritaca.invemar.org.co/siam/ccbm/ccbm\\_consultaPV1.jsp](http://buritaca.invemar.org.co/siam/ccbm/ccbm_consultaPV1.jsp)> (2019).
- 6 Clardy, J., Fischbach, M. A. & Currie, C. R. The natural history of antibiotics. *Current biology* **19**, R437-R441 (2009).
- 7 Gootz, T. D. The global problem of antibiotic resistance. *Critical reviews in immunology* **30**, 79-93 (2010).
- 8 Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* **40**, 277-283 (2015).
- 9 Clark, D. P. M., J M, Madigan, M T y Dunlap, P V Brock. *Biología de los microorganismos*. 12 edn, 1296 (Pearson Education, 2009).
- 10 Zahaed, E. & Angélica, M. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología* **11** (3) (2007).
- 11 Pathom-Aree, W. *et al.* Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles : life under extreme conditions* **10**, 181-189, doi:10.1007/s00792-005-0482-z (2006).
- 12 Okoro, C. K. *et al.* Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek* **95**, 121-133, doi:10.1007/s10482-008-9295-2 (2009).

- 13 Goodfellow, M. & Williams, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology* **37**, 189-216, doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.001201 (1983).
- 14 Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology* **176**, 386-390, doi:10.1007/s002030100345 (2001).
- 15 Hopwood, D. A. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology* **63**, 937-940, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05584.x (2007).
- 16 Cohen, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. *Science* **257**, 1050-1055 (1992).
- 17 Lowy, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* **111**, 1265-1273, doi:10.1172/JCI18535 (2003).
- 18 WHO. *Global Tuberculosis Report*. 20 edn, (World Health Organization, 2016).
- 19 WHO. What is multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and how do we control it? *WHO Media Centre* (2017).
- 20 Shah NS, W. A., Bai G-H, et al. Worldwide Emergence of Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, 380-387 (2007).
- 21 S. Rajbhandary, S. M., N. Bock. Costs of patients hospitalized for multidrug-resistant tuberculosis. *Division of Tuberculosis Elimination, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA*, 1012–1016 (2004).
- 22 Horner-Devine, M. C., Carney, K. M. & Bohannan, B. J. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings. Biological sciences* **271**, 113-122, doi:10.1098/rspb.2003.2549 (2004).
- 23 Gaitán C, S. L. & Espinal M, P. A. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la Región Caribe, Colombia. *Revista chilena de infectología* **26**, 239-246 (2009).
- 24 Melgarejo, L. et al. *Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia*. 334 (INVEMAR 2002).
- 25 SiAM. *Sistema de Información Ambiental y Marina - INVEMAR*, <<http://siam.invemar.org.co/>> (2019).
- 26 Arbeláez-Cortés, E. Knowledge of Colombian biodiversity: published and indexed. *Biodiversity and Conservation* **22**, 2875-2906, doi:10.1007/s10531-013-0560-y (2013).
- 27 Aldana-Domínguez, J. et al. Biodiversity and Ecosystem Services Knowledge in the Colombian Caribbean: Progress and Challenges. *Tropical Conservation Science* **10**, 1940082917714229, doi:10.1177/1940082917714229 (2017).
- 28 Murphy, P. & Lugo, A. Ecology of tropical dry forest. . *Annals Review of Ecology and Systematics*. **17**, 67-68 (1986. ).
- 29 Miles, L. et al. A global overview of the conservation status of tropical dry forest. *Journal of Biogeography* **33**, 491-505 (2006).
- 30 Pizano, C. & García, H. *El bosque seco tropical en Colombia*. (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2014).
- 31 Díaz, J. M. *Bosque Seco Tropical de Colombia*. (Libros de Colección Ecológica del Banco de Occidente. , 2006).
- 32 *Biota Colombiana. Especial Bosque seco en Colombia*. Vol. 13 258 (Instituto Alexander von Humboldt, 2012).
- 33 Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R., Surampalli, R. & Valero, J. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* **37**, 1-20 (2007).
- 34 Vinale, F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and molecular plant pathology* **72**, 80-86 (2008).
- 35 Martínez, L. M. N. Los acuerdos de pesca responsable en el humedal Ciénaga del Totumo (Atlántico-Bolívar) 2. 5 *Presentación 11 Impacto de la contaminación sobre la fauna en el Caribe colombiano*.
- 36 Pérez Ferro, D. et al. (Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2010).
- 37 Escolar V, A. (ed Corporación Regional Autónoma) (Plan de Ordenamiento Territorial, Corporación Regional Autónoma ).
- 38 Olivero Verbel, J. & León Ledesma, J. d. Biodiversidad y turismo para un desarrollo sostenible. (2011).
- 39 Narváez, J. C., Acero, A. & Blanco, J. Variación morfométrica en poblaciones naturalizadas y domesticadas de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) en el norte de Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc* **29**, 383-394 (2005).
- 40 Giribet, G. & Edgecombe, G. D. Reevaluating the arthropod tree of life. *Annual review of entomology* **57**, 167-186 (2012).

- 41 Hugo, S. Las Representaciones De Los Artrópodos En La Arqueología Colombiana. *Repertorio de Medicina y Cirugía* **19**, 208-214 (2010).
- 42 Rajagopal, R. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian journal of microbiology* **49**, 114-119 (2009).
- 43 Engel, P. & Moran, N. A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews* **37**, 699-735 (2013).
- 44 Clardy, J. Using genomics to deliver natural products from symbiotic bacteria. *Genome Biology* **6**, 232, doi:10.1186/gb-2005-6-9-232 (2005).
- 45 Benedict, R. G. Antibiotics Produced by Actinomycetes. *Botanical Review* **19**, 229-320 (1953).
- 46 Goodfellow, M. in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (John Wiley & Sons, Ltd, 2015).
- 47 Berdy, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**, 1-26, doi:10.1038/ja.2005.1 (2005).
- 48 Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products* **70**, 461-477, doi:10.1021/np068054v (2007).
- 49 Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Marine Drugs* **7**, 210-248, doi:10.3390/md7020210 (2009).
- 50 Adegboye, M. & Babalola, O. *Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites*. (2013).
- 51 Piel, J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural product reports* **21**, 519-538 (2004).
- 52 Beemelmanns, C., Guo, H., Rischer, M. & Poulsen, M. Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein journal of organic chemistry* **12**, 314 (2016).
- 53 Wilson, D. Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos* **73**, 274-276, doi:10.2307/3545919 (1995).
- 54 Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. & Kloepper, J. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 895-914 (1997).
- 55 Feng, Y., Shen, D. & Song, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of applied microbiology* **100**, 938-945 (2006).
- 56 Bhore, S. J., Ravichantar, N. & Loh, C. Y. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of *Sambung Nyawa* [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation* **5**, 191 (2010).
- 57 Zou, W. *et al.* Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of natural products* **63**, 1529-1530 (2000).
- 58 Guo, B. *et al.* Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species*. *Journal of natural products* **63**, 602-604 (2000).
- 59 Suffness, M. *Taxol: science and applications*. Vol. 22 (CRC press, 1995).
- 60 Harper, J. K. *et al.* Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **59**, 2471-2476 (2003).
- 61 Christina, A., Christoph, V. & Bhore, S. J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Pharmacognosy reviews* **7**, 11 (2013).
- 62 GBIF. in *Checklist Dataset* <https://doi.org/10.15468/39omei> (2017).
- 63 Olascuaga-Vargas, D., Mercado-Gómez, J. & Sanchez-Montaña, L. R. Análisis de la vegetación sucesional en un fragmento de bosque seco tropical en Tolviejo-Sucre (Colombia). *Colombia forestal* **19**, 23-40 (2016).
- 64 Brú, J. & Guzman, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **26**, 767-779 (2016).
- 65 Sánchez, Y., Correa, T. M., Abreu, Y. & Pino, O. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. *Revista de Protección Vegetal* **27**, 39-44 (2012).
- 66 Durant-Archibold, A. A., Santana, A. I. & Gupta, M. P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. *Journal of ethnopharmacology* **217**, 63-82 (2018).
- 67 Wirth, T. *et al.* Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS pathogens* **4**, e1000160 (2008).
- 68 WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008. *World Health Organization* (2008).
- 69 Barry, C. E. *et al.* The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 845-855 (2009).
- 70 Donald A, E. Why not the elimination of tuberculosis. Commentary. *Mayo Clin Proc*, 69:85-86 (1994).

- 71 Daniel, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* **100**, 1862-1870, doi:https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006 (2006).
- 72 Zink, A. R. *et al.* Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *Journal of clinical microbiology* **41**, 359-367 (2003).
- 73 Zink, A., Haas, C. J., Reischl, U., Szeimies, U. & Nerlich, A. G. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *Journal of medical microbiology* **50**, 355-366 (2001).
- 74 Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. & Holcomb, T. A. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 2091-2094 (1994).
- 75 Lehmann K.B, L. R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. **1st. ed. J.F. Lehmann, Munchen** (1896).
- 76 Sakula, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* **37**, 246-251, doi:10.1136/thx.37.4.246 (1982).
- 77 Daniel, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis [Founders of Our Knowledge]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **9**, 1181-1182 (2005).
- 78 I Kassim, R. C. Sherris Medical Microbiology (4ª edición). *McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9* (2004).
- 79 Murray PR, R. K., Pfaller MA. Microbiological Medical. *Elsevier Mosby* (2005).
- 80 Keane J, B.-S. M., Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immune* **65** (1), 298–304 (1997).
- 81 Gomez, J. E. & McKinney, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* **84**, 29-44, doi:https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.08.003 (2004).
- 82 Wooldridge, K. *Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*. (2009).
- 83 Food & Administration, D. Guidance for industry. Pulmonary tuberculosis: developing drugs for treatment. *Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm373580.pdf>. Accessed 22* (2015).
- 84 Alcaidea F, S. M. Tuberculosis multirresistente. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 54-60 (2008).
- 85 Silva, C. *et al.* Fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* **26**, 21-26 (2007).
- 86 alf
- 87 WHO. Tuberculosis. Descriptive Note. *WHO Media Centre*. (2017).
- 88 OMS & OPS. Control de la Tuberculosis en Grandes Ciudades de Latinoamérica y el Caribe. Lecciones aprendidas. *OMS - OPS* (2015).
- 89 (ed Co Atlantico) (2017).
- 90 CDC. Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **161**, S221-S247, doi:10.1164/ajrccm.161.supplement\_3.ats600 (2000).
- 91 Ruiz-Manzano, J. *et al.* Diagnosis and treatment of tuberculosis. *Archivos de bronconeumologia* **44**, 551-566 (2008).
- 92 CDC. in *Centers for Disease Control and Prevention* 2 (National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention - Division of Tuberculosis Elimination, 2011).
- 93 Arévalo Barea, A. R., Alarcón Terán, H. & Arévalo Salazar, D. E. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN TUBERCULOSIS; LO CONVENCIONAL Y LOS AVANCES TECNOLÓGICOS EN EL SIGLO XXI. *Revista Médica La Paz* **21**, 75-85 (2015).
- 94 González-Martín, J. *et al.* Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **28**, 297.e291-297.e220, doi:10.1016/j.eimc.2010.02.006 (2010).
- 95 Pai, M., Zwerling, A. & Menzies, D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of internal medicine* **149**, 177-184 (2008).
- 96 Richeldi, L. An Update on the Diagnosis of Tuberculosis Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **174**, 736-742, doi:10.1164/rccm.200509-1516PP (2006).
- 97 Navas Elorza, E. & Moreno Guillén, S. Tuberculosis multirresistente y extremadamente resistente. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria* **12**, 91-98 (2010).
- 98 Nachega, J. B. & Chaisson, R. E. Tuberculosis Drug Resistance: A Global Threat. *Clinical Infectious Diseases* **36**, S24-S30, doi:10.1086/344657 (2003).

- 99 Velayati, A. A. *et al.* Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* **136**, 420-425, doi:10.1378/chest.08-2427 (2009).
- 100 CIDRAP. *Report warns of rise in drug-resistant tuberculosis*, <<http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2017/03/report-warns-rise-drug-resistant-tuberculosis>> (2017).
- 101 Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology* **10**, 226 (1929).
- 102 Kardos, N. & Demain, A. L. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied microbiology and biotechnology* **92**, 677 (2011).
- 103 Fernandes, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nature biotechnology* **24**, 1497-1503 (2006).
- 104 Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M. & Jabes, D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J Antibiot* **63**, 423-430 (2010).
- 105 Molina, J. Terapéutica. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Autónoma de México *Recursos de Bacteriología* (2015).
- 106 Swift, M. & Bignell, D. *Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice*. (International Centre for Research in Agroforestry Bogor, Indonesia, 2001).
- 107 GoogleMaps. in *Mapa del Atlántico, Colombia en Google Maps* (2019).
- 108 Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. & Bohannan, B. J. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 448 (2002).
- 109 Uthayasooriyan, M., Pathmanathan, S., Ravimannan, N. & Sathyaruban, S. Formulation of alternative culture media for bacterial and fungal growth. *Der Pharmacia Lettre* **8**, 431-436 (2016).
- 110 Pridham, T. *et al.* A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes*. (1957).
- 111 Wayne, P. & CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute C. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standard Institute* (2006).
- 112 Duncan, K., Haltli, B., Gill, K. & Kerr, R. Bioprospecting from marine sediments of New Brunswick, Canada: exploring the relationship between total bacterial diversity and actinobacteria diversity. *Marine drugs* **12**, 899-925 (2014).
- 113 Jiang, H. *et al.* Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3832-3845, doi:10.1128/AEM.02869-05 (2006).
- 114 Rodicio, M. d. R. & Mendoza, M. d. C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **22** (2004).
- 115 Benedict, R. G., Pridham, T. G., Lindenfelser, L. A., Hall, H. H. & Jackson, R. W. Further Studies in the Evaluation of Carbohydrate Utilization Tests as Aids in the Differentiation of Species of Streptomyces. *Appl Microbiol* **3**, 1-6 (1955).
- 116 Hayakawa, M. & Nonomura, H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* **65**, 501-509 (1987).
- 117 Porter, J., Wilhelm, J. & Tresner, H. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Applied Microbiology* **8**, 174 (1960).
- 118 Baskaran, R., Vijayakumar, R. & Mohan, P. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian J Microbiol* **7**, 1-7 (2011).
- 119 Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, 399-405, doi:10.1023/a:1010287600557 (2000).
- 120 Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. & Jiang, C. Morphological identification of actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. Rijeka, Croatia: InTech*, 59-86 (2016).
- 121 Rehren, G., Walters, S., Fontan, P., Smith, I. & Zárraga, A. M. Differential gene expression between Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 347-359, doi:10.1016/j.tube.2007.02.004 (2007).
- 122 Taj, M. *et al.* *ESCHERICHIA COLI AS A MODEL ORGANISM*. Vol. 3 (2014).
- 123 Missiakas, D. M. & Schneewind, O. Growth and laboratory maintenance of Staphylococcus aureus. *Curr Protoc Microbiol Chapter 9*, Unit-9C.1, doi:10.1002/9780471729259.mc09c01s28 (2013).

- 124 Ramachandran, R., Chalasani, A. G., Lal, R. & Roy, U. A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *The scientific world journal* **2014** (2014).
- 125 Waksman, S. A., Reilly, H. C. & Johnstone, D. B. Isolation of Streptomycin-producing Strains of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **52**, 393-397 (1946).